



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos

CONICET – UNR



## **“Estudio del rol funcional de la enzima glioxalasa I de plantas en la respuesta al ataque por fitopatógenos”**

Carla Soledad Zucchetti

**Tesis para optar al título de Licenciada en Biotecnología**

Directora

Dra. Valeria A. Campos Bermudez

2018

A mi directora Vale, por su dedicación y comprensión, por apoyarme y animarme en los momentos difíciles que atravesé, pudiendo de esta manera alcanzar el objetivo buscado.

A mis compañeros del CEFOTI, con quienes compartimos las tareas de laboratorio, quienes además de ser buenos compañeros, son grandes personas.

A todos mis amigos que me acompañaron y sostuvieron en los momentos que las fuerzas flaquean y se necesita de ellos para fortalecerse, y seguir adelante.

A los que me acompañaron en las últimas materias y lograron sacar lo mejor de mí en esos momentos de locura, haciendo que cada momento duro se transforme en sonrisas.

A familia quienes me acompañaron y apoyaron durante toda mi carrera y los que siempre confían en mí.

## Índice

Tesis para optar al título de Licenciada en Biotecnología .....	1
ABREVIATURAS.....	7
ANGLICISMOS.....	8
Resumen.....	9
1. Introducción .....	10
1.1. Sistema glioxalasa.....	10
1.1.1. Generación y toxicidad del metilglioxal .....	12
1.1.2. Sistema glioxalasa en plantas.....	13
1.1.3. Características estructurales y bioquímicas de la glioxalasa I.....	16
1.1.3.1. Glioxalasa I de maíz (ZmGLYI).....	16
1.1.3.2. Glioxalasa I de <i>A. thaliana</i> .....	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. Objetivo general.....	19
2.2. Objetivos específicos .....	19
3. Materiales y Métodos .....	20
3.1. Cepas bacterianas y plásmidos.....	20
3.2. Medios de cultivo... ..	20
3.3. Material vegetal.....	21
3.3.1. <i>A. thaliana</i> .....	21
3.3.1.1. Crecimiento de plantas en tierra .....	21
3.3.1.2. Crecimiento de plantas en placa .....	22

3.4. Obtención de líneas mutantes homocigotas en <i>AtGLYI</i> .....	22
<i>Extracción de ADN genómico de las líneas de trabajo</i> .....	22
<i>Diseño de oligonucleótidos cebadores y PCR para verificar homocigosis</i> .....	23
3.5. Obtención de líneas transgénicas sobreexpresantes de <i>ZmGLYI</i> .....	27
<i>Extracción de ADN plasmídico</i> .....	27
<i>Preparación de A. tumefaciens GV3101 pSOUP competentes</i> .....	27
<i>Transformación de A. tumefaciens mediante el método de congelamiento-descongelamiento</i> .....	28
<i>PCR de colonias</i> .....	28
<i>Preparación de A. thaliana para la transformación</i> .....	29
<i>Transformación de A. thaliana mediada por A. tumefaciens (Floral Dip)</i> .....	29
<i>Selección de transformantes putativas utilizando herbicida como marcador de selección</i> .....	30
<i>Verificación de la inserción del T-DNA mediante extracción de ADN y PCR</i> .....	30
<i>Validación de las transformantes T3 obtenidas</i> .....	31
3.6. Ensayos de infección de plantas de <i>Arabidopsis</i> con <i>Pseudomonas syringae</i> .....	31
<i>Crecimiento de P. syringae</i> .....	31
<i>Infección con el patógeno y toma de muestra</i> .....	31
<i>Cuantificación de bacterias dentro del tejido vegetal</i> .....	32
3.7. Determinación de niveles transcripcionales mediante qRT-PCR.....	33
<i>Extracción de ARN total</i> .....	33
<i>Determinación de la integridad del ARN total extraído</i> .....	33
<i>Determinación de la cantidad del ARN total extraído</i> .....	33
<i>Eliminación de ADN genómico</i> .....	34

3.7.1. Retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) .....	35
<i>Reacción de transcripción reversa (Retrotranscripción) .....</i>	<i>35</i>
<i>Diseño de oligonucleótidos cebadores y verificación de su especificidad.....</i>	<i>35</i>
<i>Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR).....</i>	<i>37</i>
<i>Análisis estadístico .....</i>	<i>37</i>
4. Resultados .....	38
4.1. Evaluación del rol de la enzima glioxalasa I de <i>Arabidopsis thaliana</i> en respuesta a estrés biótico.....	38
<i>Análisis fenotípico de severidad de síntoma de plantas de Arabidopsis col0: .....</i>	<i>38</i>
<i>Cuantificación de la población bacteriana en tejido de hojas de plantas col0 inoculadas con el patógeno .....</i>	<i>39</i>
Extracciones de ARN total y determinación de la calidad del ARN total extraído .....	41
Análisis de especificidad de los cebadores diseñados para los transcritos <i>AtGLYI2</i> , <i>AtGLYI3</i> y <i>AtGLYI6</i> .....	42
Determinación de la expresión de <i>AtGLYI2</i> , <i>AtGLYI3</i> y <i>AtGLYI6</i> de <i>A. thaliana</i> en plantas col0 sometidas a estrés biótico.....	42
4.1.1. Obtención de líneas mutantes <i>knockout</i> homocigotas en los genes <i>ATGLYI2</i> , <i>ATGLYI3</i> y <i>ATGLYI6</i> .....	43
<i>Extracción de ADN genómico de las líneas de trabajo .....</i>	<i>45</i>
<i>PCR para verificar homocigosis .....</i>	<i>45</i>
<i>Verificación de los niveles del ARNm AtGLYI en líneas homocigotas para la inserción .....</i>	<i>47</i>
4.1.2. Obtención de líneas transgénicas sobreexpresantes de <i>ZmGLYI</i> .....	48
<i>Transformación estable de A. thaliana mediada por A. tumefaciens (Floral dip).....</i>	<i>48</i>
<i>Selección de líneas transgénicas sobreexpresantes .....</i>	<i>51</i>
<i>Verificación de la presencia del ARNm ZmGLYI las líneas transformantes obtenidas .....</i>	<i>51</i>

4.1.3. Ensayos de infección por el patógeno en plantas de <i>Arabidopsis</i> col0, mutantes en las distintas GLYI y sobreexpresantes en glioxalasa I de maíz .....	52
<i>Análisis fenotípico de severidad de síntoma en plantas wild type, transformantes y knock out</i> .....	52
<i>Cuantificación de las unidades formadoras de colonia en plantas wild type, transformantes y knock out</i> .....	54
<i>Determinación de los niveles del transcripto AtGLYI2, AtGLYI3 y AtGLYI6 en cada uno de los genotipos ensayados</i> .....	55
5. Discusión.....	56
6. Conclusiones.....	60
7. Referencias Bibliográficas.....	61

## ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

Col-0: ecotipo salvaje Columbia 0

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

GSH: Glutatión reducido

GLYI: Glioxalasa I

ZmGLYI: Glioxalasa I de maíz

HTA: Hemitioacetal

LB: Medio Luria-Bertani

MG: Metilglioxal

MgCl<sub>2</sub>: cloruro de magnesio

MS: medio Murashige & Skoog

NaCl: cloruro de sodio

OD: densidad óptica

ON: Durante toda la noche, del inglés *over night*

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

rpm: revoluciones por minuto

TBE: Tris borato EDTA

UTR: región no traducida

KD: mutante knockdown

KO: mutante knockout

## ANGLICISMOS

Buffer: Solución tampón

Pellet: Fracción insoluble

Knockout: Inactivación de un gen

Knock down: Gen cuya expresión se encuentra disminuida

Splicing: Proceso de corte y empalme del mRNA



## Resumen

El sistema glioxalasa es una vía ubicua esencial para la homeostasis celular, presente en eucariotas y procariotas. Cumple un rol muy importante en las vías de detoxificación del metilglioxal (MG), un subproducto altamente tóxico del metabolismo, generado en mayor medida bajo condiciones de estrés celular. El control de los niveles de MG en la célula es crucial ya que niveles elevados han sido asociados con diferentes patologías en humanos. Además, en plantas se ha vinculado la acción de este sistema con la tolerancia a diferentes estreses de tipo abiótico y biótico. Particularmente, en nuestro grupo de trabajo esta enzima ha sido previamente detectada en mayores niveles en una línea de maíz moderadamente resistente al ataque por el hongo fitopatógeno *Fusarium verticillioides*, en comparación a los niveles observados en la línea susceptible. En este contexto, el presente trabajo de tesina pretende evaluar el rol fisiológico de glioxalasa I frente a la tolerancia a estrés biótico en plantas. Para cumplir con este objetivo utilizamos el siguiente patosistema: *Arabidopsis thaliana* (planta modelo) y *Pseudomonas syringae* pv. TOMATO DC3000 (inductor de estrés biótico). Para esto, se procedió por un lado a la obtención de mutantes de *A. thaliana* en los genes codificantes para tres isoformas de glioxalasa I y por el otro, a la generación de plantas transgénicas que sobreexpresen la enzima GLYI de maíz. Las plantas salvaje, *knockout* y sobreexpresantes en glioxalasa I fueron sometidas a infección con el patógeno y se evaluó la resistencia o susceptibilidad de cada uno de los genotipos.

# 1.Introducción

Con el objetivo de identificar componentes bioquímicos y moleculares que determinen la resistencia de maíz (*Zea mays*) al patógeno *F. verticillioides*, en el laboratorio se han estudiado previamente las respuestas inducidas por el hongo en líneas moderadamente resistentes y susceptibles mediante técnicas de transcriptómica, proteómica y metabolómica (Campos-Bermudez et al., 2013). La comparación entre dos líneas con fenotipos contrastantes en cuanto a la respuesta a la infección por *F. verticillioides*, a través de la técnica 2D-DIGE y el posterior análisis por espectrometría de masas permitió detectar diversas proteínas probablemente involucradas en los mecanismos de defensa contra el patógeno. En base a estos resultados resultó de sumo interés, por el rol fisiológico que cumple, la proteína glioxalasa I, enzima implicada en la detoxificación del metilglioxal.

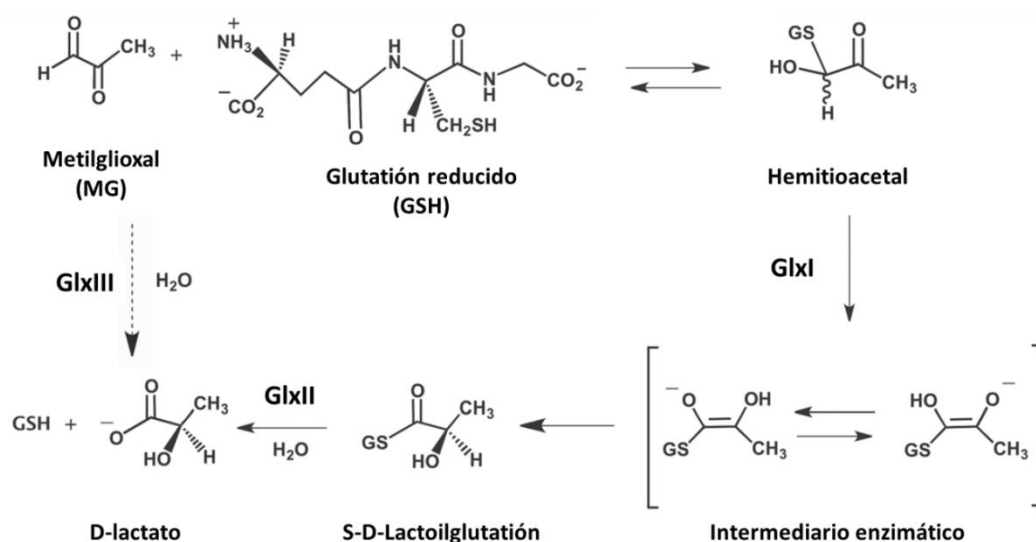
## 1.1.Sistema glioxalasa

El sistema glioxalasa es una vía ubicua esencial para la homeostasis celular, presente tanto en eucariotas como procariotas. Consiste en un grupo de enzimas que convierten  $\alpha$ -cetoaldehídos en D-hidroxiácidos. Las dos enzimas más caracterizadas de este sistema son dos metaloenzimas, la glioxalasa I (GLYI) (lactoilglutación liasa 4.4.1.5) y la glioxalasa II (GLYII) (hidroxiacilglutación hidrolasa 3.1.2.6) (**Figura 1-1**). En conjunto, estas dos enzimas catalizan la isomerización del  $\alpha$ -cetoaldehído metilglioxal (MG) a D-lactato utilizando glutatión reducido (GSH) como cofactor. Por otro lado, la enzima glioxalasa III (GLYIII) (D-lactato deshidratasa 4.2.1.130), perteneciente a este sistema es capaz de convertir irreversiblemente el MG en D-lactato en un único paso sin la intervención de cofactor e independiente de iones metálicos para su actividad (Misra et al., 1995; Subedi et al., 2011). Esta proteína, que se identificó en lisados de extracto total de *E. coli* también fue reportada en humanos (Lee, 2012), *Arabidopsis* (Kwon, 2013), *Candida albicans* (Hasim, 2014) y *Schizosaccharomyces pombe* (Zhao et al., 2014).

A principios del siglo XX, se pensaba que el sistema glioxalasa formaba parte de la vía glicolítica y la fermentación alcohólica. El hallazgo posterior de la triosa fosfato isomerasa y el resto de las enzimas de la vía Emden-Meyorhof-Parnas, desplazaron al MG y

sus enzimas como partes fundamentales de esta vía. De esta forma, el sistema glioxalasa permaneció como un artefacto del metabolismo, sin reconocida importancia, por más de 60 años. No se efectuaron otros trabajos importantes más que el descubrimiento de que el MG era producido no enzimáticamente a partir de las triosas fosfatos, dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (G3P), y que la actividad glioxalasa estaba conformada por dos enzimas, la glioxalasa I y la glioxalasa II (Racker, 1951).

El sistema recobró atención, con el descubrimiento de que el metilglioxal es altamente tóxico y su correcta eliminación parece ser crucial para la homeostasis celular (Gorna-Hall et al., 1974). Hoy en día, el sistema glioxalasa, se considera que cumple un rol muy importante en las vías de detoxificación de MG así como en los mecanismos de respuesta al estrés celular. Debido a esto, se han generado en los últimos años diversas áreas de investigación en el contexto de enfermedades humanas, tales como diabetes, enfermedades vasculares, desordenes neurodegenerativos, enfermedad de Parkinson, malaria, Alzheimer y cáncer (Krautwald y Munch, 2010; Cordeiro et al., 2013; CG, 2015; Stehouwer et al., 2015). Más recientemente en plantas, se ha vinculado la acción de este sistema con la tolerancia a estrés salino, sequía y toxicidad a metales pesados. Es por esto que existe una amplia perspectiva en utilizar esta enzima en la obtención de cultivos resistentes a estos estreses abióticos (Sopory et al., 2008).



**Figura 1-1. Sistema glioxalasa.** Vía enzimática compuesta por GLXI y GLXII, que convierten el hemitioacetal (HTA), compuesto generado no enzimáticamente por la reacción entre el MG y GSH, en D-Lactato. El HTA es convertido por la GLXI en S-D lactoilglutatión, en una reacción de isomerización. Luego, la GLXII convierte este compuesto en D-lactato y libera el GSH en una reacción de hidrólisis. Otra vía, involucra únicamente a la enzima GLXIII, que convierte directamente al MG en D-lactato, sin la utilización de GSH.

#### 1.1.1. Generación y toxicidad del metilglioxal

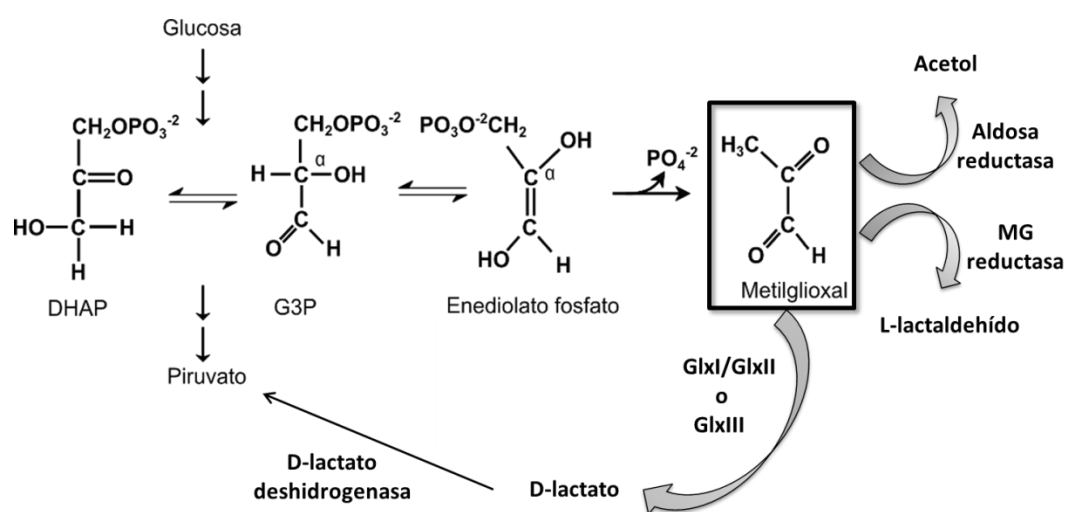
La velocidad de generación del MG depende ampliamente del organismo, del tejido, el metabolismo celular y sus condiciones fisiológicas. La conversión no enzimática de las triosas fosfato, DHAP (dihidroxi acetona fosfato) y G3P (gliceraldehído 3 fosfato), a MG se considera la principal contribución de MG a nivel celular (Richard, 1993). Estos compuestos, intermediarios de la glicólisis, son altamente reactivos e inestables; a pH fisiológico tienen alta tendencia a perder su protón  $\alpha$ -carbonilo, generando un enediolato fosfato que cuenta con una baja barrera energética para perder su grupo fosfato y generar de esta manera MG (Figura 1-2).

Existen otras rutas de formación de MG, entre las que se incluyen el metabolismo de aminoácidos, la oxidación de la aminoacetona en el catabolismo de la L-treonina, la oxidación de cuerpos cetónicos y la oxidación de la acetona (Cordeiro et al., 2013). Otras vías no enzimáticas incluyen la reacción de Maillard y la lipoperoxidación (Thornalley, 1990).

La toxicidad del MG reside en que es un compuesto altamente reactivo y se encuentra entre los electrófilos más fuertes encontrados en los sistemas biológicos (Cordeiro et al., 2013). El mismo es capaz de reaccionar con proteínas, principalmente con

los grupos guanídios de los residuos de arginina y amino de la lisina, en una reacción conocida como glicación (Thornalley y Rabbani, 2012). Esto da como resultado grupos derivados de hidroimidazolones. El MG también es capaz de reaccionar de manera análoga, con otras macromoléculas, como ácidos nucleicos y fosfolípidos básicos. Si bien los estudios indican que la extensión de estos fenómenos *in vivo* es baja, se piensa que la modificación química de estas macromoléculas, fundamentales para las funciones biológicas, es suficiente para alterar el metabolismo celular. Se demostró que la glicación de argininas que forman parte de sitios activos produce inhibición enzimática (Freire et al., 2006) y que la aparición de productos de glicación está fuertemente vinculada con el desarrollo y el progreso de diferentes condiciones patológicas en humanos (Thornalley y Rabbani, 2011).

De esta manera, las enzimas glioxalosas, junto con otras tales como las aldo-ceto reductasas, juegan un rol crítico en la eliminación de los compuestos dicarbonilos antes de que ocurra la reacción entre éstos y moléculas blanco, produciendo la toxicidad celular.



**Figura 1-2.** Algunas de las vías biológicas que conducen hacia y desde MG incluyendo la posición de las enzimas GLXI, GLXII y GLXIII.

### 1.1.2. Sistema glioxalasa en plantas

Si bien prácticamente todos los estudios relacionados con la importancia del sistema fueron hechos en mamíferos y otros animales, los primeros indicios del rol del sistema glioxalasa en plantas estuvieron íntimamente relacionados con estudios en estrés

abiótico. Numerosas evidencias indicaron que plantas que lograban mantener niveles bajos de MG, eran capaces de tolerar diversas condiciones de estrés.

Se encontró que los niveles de glioxalasa I aumentan en plantas sometidas a estrés salino, hídrico y exposición a metales pesados. En cuanto a la glioxalasa II, también se encontró que aumenta sus niveles de expresión por sequía, NaCl, calor, frío y metales pesados en mostaza, arroz y cebolla (Saxena et al., 2005; Yadav et al., 2007; M.Z., 2009). Mustafiz et al., (2011), vinculó los altos niveles de expresión de los genes GLXI y GLXII de arroz con la resistencia a distintos tipos de estreses abióticos.

Con respecto a la glioxalasa III, se encontró que, en arroz, aumenta significativamente su expresión frente a varios estreses abióticos, tales como salinidad, calor, frío, estrés oxidativo ( $H_2O_2$ ), estrés dicarbonilo (MG exógeno) y toxicidad por metales pesados (As y Cu). A su vez, dicha proteína interactúa con varias proteínas inducidas por estrés tales como superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (Ghosh et al., 2016).

La racionalización de dichas observaciones estaría vinculada con la generación del MG. Cuando las plantas están bajo condiciones de estrés, las células aumentan el metabolismo primario, lo cual se refleja en la regulación positiva de las enzimas involucradas en la glicólisis y en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Umeda et al., 1994). Como resultado de esto, la velocidad de la glicólisis aumenta, generando un desequilibrio en esta vía. Esto produce un incremento en el flujo de las triosas fosfatos y un concomitante incremento en los niveles de MG (Sopory et al., 1999). En este sentido, el sistema glioxalasa sería crucial para sobrellevar las condiciones de estrés, ya que contribuiría a la reducción de los niveles de MG.

Además de la detoxificación del MG, se ha propuesto un mecanismo adicional para explicar el rol de este sistema en plantas durante la respuesta a estrés, que es la regeneración de GSH (Hossain et al., 2011). Como puede verse en la **Figura 1-1** el MG puede reaccionar de forma no enzimática con el glutatión reducido, formando el hemitioacetal (HTA). De esta manera, el GSH es titulado del medio celular e inutilizado. Por lo tanto, altos niveles de metilglioxal que se acumulan durante el estrés, además de ser tóxicos, podrían disminuir la concentración celular del glutatión reducido. Se sabe que el glutatión es un metabolito muy importante, el cual está involucrado en la protección de las

plantas contra el estrés oxidativo generado durante varios estreses ambientales (May et al., 1998). En contraste con este mecanismo, la GLXIII es independiente de GSH, por lo cual la regeneración de dicho compuesto no sería su función más importante (Ghosh et al., 2016).

De esta manera, la sobreexpresión de las enzimas que forman parte del sistema glioxalasa pueden controlar no solo el aumento en los niveles de MG sino que también ayuda a mantener una elevada relación glutatión reducido-glutatión oxidado (Yadav et al. 2005). Estas observaciones podrían estar vinculadas a la tolerancia a estrés abiótico de plantas transgénicas que sobreexpresan las enzimas del sistema glioxalasa (Singla-Pareek et al. 2003).

Además, en plantas que sobreexpresan la vía glioxalasa completa, se ha visto una mayor expresión de genes relacionados con la respuesta al estrés. El análisis *in silico* de estos genes de defensa reveló la presencia de posibles elementos *cis* de respuesta a MG de 7-8 pb, sugiriendo un vínculo entre la acumulación de MG en las plantas transgénicas y la regulación transcripcional de estos genes relacionados con la respuesta al estrés (Kaur et al., 2015). Sin embargo, se requieren mayores evidencias para dilucidar fehacientemente dicha conexión.

Se cuenta con una amplia información sobre el rol del sistema glioxalasa frente a la respuesta a estrés abiótico en plantas, pero existen pocos datos sobre su función en relación a estrés de tipo biótico. Algunos trabajos han relacionado los niveles de MG y la enzima glioxalasa I en plantas al ataque de patógenos. En trigo por ejemplo, se encontró que la inoculación con el hongo *Fusarium graminearum* induce los niveles transcripcionales de la glioxalasa I (Li et al., 2010). Además, se ha encontrado que la infección por el patógeno *Aspergillus flavus* en plantas de maíz incrementa significativamente los niveles de metilglioxal en los genotipos susceptibles al hongo. Siendo estos niveles superiores a los observados en líneas resistentes al patógeno. En concordancia con esto, se ha detectado una mayor actividad constitutiva de la enzima glioxalasa I en la línea resistente con respecto a la susceptible (Chen et al., 2004). Además, un análisis a nivel de expresión de proteína GLY I en núcleos de embriones de maíz resistentes a *A. flavus* mostraron una mayor expresión en comparación con el genotipo susceptible en respuesta a la infección por *A. flavus* (Chen et al., 2004). Un patrón similar de inducción de la enzima GLY I se

observó en arroz y *Brassica* después de la infección por *Nilaparvata lugens* y *Sclerotinia sclerotiorum*, respectivamente (Chen et al., 2004; Sangha et al., 2013). Estos hallazgos apuntan a una posible función de la vía glioxalasa en la modulación del estrés biótico en plantas.

### 1.1.3. Características estructurales y bioquímicas de la glioxalasa I

Hasta el momento, más de 60 secuencias de glioxalasa I han sido reportadas (<http://www.brenda-enzymes.org>). Las glioxalosas I aisladas y estudiadas de distintas fuentes, presentan una gran diversidad en sus características. Existen diferencias en la dependencia de metal, estado oligomérico, arreglo estructural, números de sitios activos y aminoácidos involucrados en la catálisis. Pese a que existe tal variedad, se destaca que la enzima logre mantener esencialmente su actividad catalítica.

Existen dos grupos de glioxalasa I clasificados según la dependencia de ión metálico; las activadas por Zn(II) (*Homo sapiens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas putida*) y las activadas por Ni(II) o no activadas por Zn (II) (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Oryza sativa*, *Zea mays*) (Suttisansanee et al., 2014, Turra et al., 2015). También existe variedad en el número de subunidades que conforman la enzima activa, existen subunidades de alto peso molecular que constituyen monómeros y subunidades de bajo peso que constituyen homodímeros.

#### 1.1.3.1. Glioxalasa I de maíz (ZmGLYI)

Previamente, en el marco de un trabajo en colaboración con el EEA-INTA Pergamino se realizaron ensayos de infección a campo con el hongo *F. verticillioides* y se detectaron dos líneas de maíz con fenotipos contrastantes en cuanto a la respuesta a la infección, una línea moderadamente resistente y otra susceptible. A través de la técnica 2D-DIGE y el posterior análisis por espectrometría de masas se detectaron diversas proteínas involucradas en los mecanismos de defensa, de las cuales, nos resultó de sumo interés por el rol fisiológico que cumple, la proteína glioxalasa I. Recientemente, nuestro grupo de trabajo pudo dilucidar la estructura de la enzima glioxalasa I de *Zea mays* (Turra et al., 2015). En base a ensayos bioquímicos sobre los requerimientos de metal para la actividad enzimática, pudimos corroborar lo predicho a partir del análisis de secuencia, que ZmGLYI es una metaloenzima con preferencia de Ni(II) sobre otros iones metálicos.



### 1.1.3.2. Glioxalasa I de *A. thaliana*

En *Arabidopsis*, veintidós proteínas GLYI están codificadas por once genes y nueve proteínas GLYII están codificadas por cinco genes. Esto sugiere la presencia de productos de *splicing* alternativo para ambas enzimas en dicho genoma. En posteriores análisis *in silico*, se evaluó la presencia de distintos dominios importantes requeridos para la actividad glioxalasa I, en cada uno de estos once genes GLYI. Estos dominios incluyen el sitio de unión al metal, interfase dimérica y sitio activo para catalizar la reacción. De los once genes, solo *AtGLYI2*, *AtGLYI3* y *AtGLYI6* poseen tanto el sitio de unión al metal como el sitio activo, y se predijo en base a su secuencia que codifican proteínas activas, mientras que los otros genes carecen de algún dominio (Mustafiz et al; 2011).

En cuanto a la dependencia de metal, recientemente se reportó que *AtGLYI2* sería una enzima dependiente de  $Zn^{2+}$ , mientras que *AtGLYI3* y *AtGLYI6* serían dependientes de  $Ni^{2+}$  (Mukan et al; 2016). Se observó que la actividad de la enzima dependiente de  $Zn^{2+}$  es excepcionalmente alta comparada con las enzimas dependientes de  $Ni^{2+}$ , *AtGLYI3* y *AtGLYI6*. (Mustafiz et al., 2016)

Con respecto a la expresión de dichos genes en condiciones normales, se encontró que *AtGLYI6* posee mayor expresión constitutiva en la mayoría de los tejidos de la planta, indicando su función en todos los estadios de desarrollo. La expresión de *AtGLYI2* es moderada en otros tejidos que no sean hojas sometidas a tratamiento con ácido salicílico. La expresión de *AtGLYI3* es específicamente alta en callos, inflorescencias, raíces y silicuas. (Mustafiz et al., 2011)

Para poder ahondar en el estudio del sistema glioxalasa y su relación con la resistencia al estrés en plantas, nos propusimos evaluar el rol funcional de la enzima glioxalasa I de *A. thaliana* en respuesta a estrés biótico, así como evaluar el efecto de la sobreexpresión de la enzima GLYI de maíz en *A. thaliana*. Este organismo vegetal modelo ha sido y es extensamente estudiado, con múltiples procesos moleculares experimentalmente definidos en detalle. Adicionalmente, *A. thaliana* ofrece numerosas herramientas de trabajo y de construcción de nuevos genotipos de interés, lo cual puede proveer evidencia experimental respecto al comportamiento del sistema glioxalasa en relación con la respuesta de defensa de las plantas a estrés biótico.

En el presente trabajo de tesina, utilizamos *Pseudomonas syringae*, una bacteria gram negativa que infecta una amplia variedad de plantas, entre las que se encuentra *A. thaliana*. Durante el proceso de infección, *P. syringae* ingresa a los tejidos del hospedador (usualmente hojas) a través de heridas o aberturas naturales tales como estomas. En plantas susceptibles, *P. syringae* se multiplica hasta alcanzar una gran población en los espacios intracelulares y genera en etapas tardías de la infección lesiones necróticas rodeadas de clorosis difusa. En plantas resistentes, sin embargo, *P. syringae* desencadena la respuesta hipersensible, una muerte rápida asociada a defensa de las células en contacto con el patógeno. En esta situación *P. syringae* no se multiplica hasta alcanzar altos niveles y no causa síntomas de enfermedad (Katagiri et al; 2002).

## 2.OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

- ✓ Evaluar el rol de la glioxalasa I en plantas de *A. thaliana* frente a condiciones de estrés biótico.

### 2.2. Objetivos específicos

- ✓ Analizar el perfil de expresión de las isoformas de glioxalasa I de *A. thaliana* en respuesta a la infección por *P. syringae*
- ✓ Obtener mutantes de *A. thaliana* en los genes codificantes de GLXI afectados por la infección del patógeno.
- ✓ Generar plantas de *A. thaliana* transgénicas que sobre-expresen la enzima glioxalasa I de maíz
- ✓ Analizar fenotípicamente la severidad de síntoma de plantas de Arabidopsis mutantes y sobre-expresantes en glioxalasa I en respuesta a la infección por el patógeno.

## 3. Materiales y Métodos

### 3.1. Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo se describen en las siguientes tablas:

**Tabla III-I. Cepas bacterianas**

Cepa bacteriana	Descripción
<i>E. coli</i> K-12 DH5 $\alpha$	<i>recA endA thi hsdR supE relA deoR lac</i> [ $\Phi$ 80, <i>lacZ</i> $\Delta$ M15]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> pSOUP GV3101	Cepa utilizada para la transformación de <i>A. thaliana</i> . C58, rif <sup>R</sup> (resistencia genómica), plásmido Ti (helper) gentaR. pSOUP, función de replicación para ori pSA, tetraR
<i>Pseudomona syringae</i> pvTOMATO DC3000	Cepa utilizada para la infección de <i>A. thaliana</i> .

**Tabla III-II. Plásmidos.** *kan<sup>+</sup>* y *bla<sup>+</sup>*: resistencia a kanamicina y ampicilina, respectivamente. *blpR*: resistencia a bialophos.

Plásmido	Descripción
pGreen II	<i>kan<sup>+</sup></i> , 5100 pb, ori ColE1, <i>blpR</i> , SMC y terminador OCS, vector binario para la transformación de plantas mediante <i>A. tumefaciens</i>

### 3.2. Medios de cultivo

En esta sección se detallan los medios utilizados tanto para el crecimiento de *E. coli* DH5 $\alpha$ , *A. tumefaciens* como para la regeneración de plantas.

Luria-Bertani (LB): triptona de caseína 1% (P/V), extracto de levadura 0,5 % (P/V), NaCl 1%.

Luria-Bertani (LB) agar: triptona de caseína 1% (P/V), extracto de levadura 0,5 % (P/V), NaCl 1%, agar 1,5% (P/V).

**King's:** peptona 2% (P/V), glicerol 1% (V/V), fosfato ácido de potasio 0,15% (V/V), sulfato de magnesio pentahidratado 0.15% (V/V).

**King's agar:** peptona 2% (P/V), glicerol 1% (V/V), fosfato ácido de potasio 0,15% (V/V), sulfato de magnesio pentahidratado 0.15% (V/V), agar 1,5% P/V.

**Medio Murashige y Skoog (MS) agar:** pH 5,7, agar 0,8 % (P/V), utilizado en la regeneración de plantas.

### 3.3. Material vegetal

#### 3.3.1. *A. thaliana*

Diversas líneas genotípicas de *A. thaliana* fueron seleccionadas y obtenidas para la caracterización funcional de *AtGLYI*. La línea salvaje empleada corresponde al ecotipo Columbia-0 (*col-0*). Adicionalmente, en el presente trabajo fueron generadas líneas transgénicas que sobreexpresan *ZmGLYI* constitutivamente y además se generaron líneas homocigotas mutantes en *AtGLYI2*, *AtGLYI3* y *AtGLYI6* a partir de semillas adquiridas comercialmente de la colección Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC, <https://abrc.osu.edu>). Estas líneas son mutantes por inserción del T-DNA en el gen de interés, por lo que interrumpen la función génica en las isoformas de *AtGLYI2*, *AtGLYI3* y *AtGLYI6*.

##### 3.3.1.1. Crecimiento de plantas en tierra

Las semillas de *A. thaliana* fueron depositadas sobre tierra estéril húmeda con agregado de vermiculita. Las macetas se colocaron en bandejas, se cubrieron con Saran Wrap (papel film de cocina) para evitar la pérdida de humedad y luego papel aluminio, para mantenerlas en oscuridad. Posteriormente, se estratificaron 72 h a 4 °C, proceso que permitió que las semillas abandonen el período de dormancia y germinen de manera sincronizada. A continuación, las bandejas se trasladaron a cámara de cultivo operando bajo un fotoperíodo de luz / oscuridad de 16 h / 8 h, 70 % de humedad relativa y con un flujo de luz de 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ . La temperatura de crecimiento normal fue de 24 °C. Las macetas fueron irrigadas dos veces por semana durante la totalidad de su ciclo de vida, mediante inundación moderada de las bandejas. Este sistema de riego inferior permite evitar una excesiva humedad durante la germinación y el crecimiento vegetativo.

### 3.3.1.2.Crecimiento de plantas en placa

Para llevar a cabo ensayos fenotípicos, semillas de *A. thaliana* de las líneas en estudio fueron previamente esterilizadas en flujo laminar bajo el siguiente protocolo. En primer lugar, se incubaron con una solución de etanol 50 % (v/v) suplementada con 0,5 % (v/v) Tritón durante 3 min. Luego, se lavaron con etanol comercial y finalmente se secaron en papel de filtro estéril. Una vez esterilizadas, se sembraron las semillas con palillo estéril en placas de cultivo con medio 1 X MS pH=5,7 (ajustado con KOH) (Phytotechlab) y 0.8 % (p/v) de agar. Las placas fueron cerradas con cinta 3M (Micropore™) para preservarlas de contaminaciones. Estratificación y crecimiento fueron aplicados como se mencionó anteriormente para el crecimiento de plantas en suelo.

### 3.4.Obtención de líneas mutantes homocigotas en *AtGLYI*

Se solicitaron al ABRC los siguientes stock de semillas que presentaban inserción del T-DNA en los genes *AtGLYI2*, *AtGLYI3* y *AtGLYI6*:

~ SALK\_131547 y SALK\_131526 (mutantes del gen *AtGLYI2*)

~ SALK\_103699, SALK\_059170 y SALK\_110070 (mutantes del gen *AtGLYI3*)

~ SALK\_057042, SALK\_142650, SALK\_116876 y SAIL\_706 (mutantes del gen *AtGLYI6*)

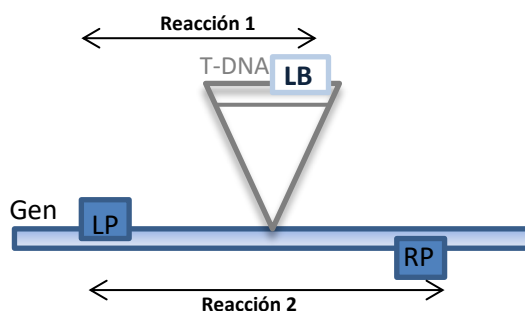
#### *Extracción de ADN genómico de las líneas de trabajo*

Inicialmente, las semillas adquiridas comercialmente a partir del ABRC fueron cultivadas como se describe en (sección 3.3.1.1) con el fin de corroborar las mutaciones por inserción de T-DNA en estado de homocigosis; es decir, aquellos individuos y su descendencia en los que los genes *AtGLYI* se encuentren silenciados por la inserción en ambos alelos. La masa correspondiente a 100 mg de hoja fresca fue pulverizada en un mortero con N<sub>2</sub> líquido. A continuación, se agregaron 0,6 ml de buffer de extracción de DNA (1,4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH=8,0, 20 mM EDTA, 2 % (p/v) CTAB) y se incubó la mezcla a 65 °C durante 15 min. Posteriormente, se adicionaron 0,2 ml de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) invirtiendo suavemente durante 2 min. Se centrifugó la mezcla por 10 min a 11600 x *g* y el sobrenadante acuoso se transfirió cuidadosamente a

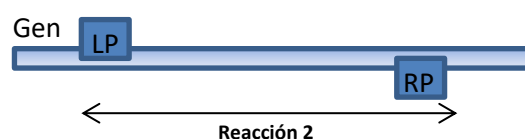
un nuevo tubo. Luego, el ADN genómico se precipitó mediante la adición de 0,8 ml de isopropanol, incubándose a -20 °C durante al menos 20 min. El ADN precipitado se recuperó por centrifugación durante 15 min a 11600 x *g* y se lavó con 800 µl de etanol 70 % (v/v) para eliminar sales. A continuación, se centrifugó durante 2 min a velocidad máxima, se descartó el sobrenadante y se repitió la centrifugación a velocidad máxima durante 1 min. El ADN precipitado se secó a temperatura ambiente y se resuspendió suavemente en 50 µl de H<sub>2</sub>O destilada. La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de 1 % (p/v) agarosa en 0,5 µg/ml de SyberSafe, utilizando como marcador de peso molecular 0,5 µg de ADN del fago λ digerido con *EcoRI* y *HindIII* (Promega).

#### *Diseño de oligonucleótidos cebadores y PCR para verificar homocigosis*

Se utilizó como molde ADN genómico extraído de hojas jóvenes y las reacciones de amplificación fueron diseñadas para cada una de las líneas de la siguiente manera: **reacción 1** usando cebador específico que hibrida con el borde izquierdo del T-DNA (LB) y cebador específico reverso que hibrida con cada uno de los genes (LP); **reacción 2** usando los cebadores LP y RP específicos de cada gen. Como control se utilizó ADN genómico proveniente de hojas jóvenes de plantas salvajes, corroborando que, en ellas, solo se obtendría amplificado para la reacción 2. En la **Figura 3-1** se muestra un esquema de cada uno de los genotipos posibles.

a) Mutantes *knockout*

## b) Wild type



**Figura 3-1. Esquema simplificado de la obtención de productos de PCR para plantas de *Arabidopsis* KO y col0.** LP y RP son los cebadores que hibridan con los bordes izquierdo y derecho del DNA genómico, mientras que LB es el cebador que hibrida con el borde izquierdo del T-DNA. A) Aquellas líneas que poseen la inserción del T-DNA en los dos alelos del gen *AtGLYI* son homocigotas para la inserción, por lo tanto sólo dan resultado positivo para la reacción 1, mientras que las líneas heterocigotas para la inserción dan amplificación para ambas reacciones. B) En las plantas col0 no hay inserción del T-DNA, por lo tanto no se observa amplificación en la reacción 1, pero sí en la reacción 2.

Las reacciones de PCR se desarrollaron en un volumen final de 20  $\mu$ L, 0,2 mM de dNTPs, 1  $\mu$ M de oligonucleótidos cebadores, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , buffer de amplificación 1X (suministrado por el proveedor de la enzima) y 1 U de ADN Polimerasa Taq Pegasus (PB-L).

La amplificación se realizó en un termociclador Gene AmpR PCR System 2400 (Perkin Elmer), comenzando con una etapa de 4 minutos a 94  $^{\circ}$ C, seguida de 30 ciclos compuestos por tres etapas: 1 minuto a 94  $^{\circ}$ C, 40 segundos a 56  $^{\circ}$ C y 40 segundos o 1 minuto a 72  $^{\circ}$ C dependiendo del tamaño del amplicón generado en función del par de oligonucleótidos utilizados. Por último, se realizó una etapa de 5 min a 72  $^{\circ}$ C. Los productos se analizaron por electroforesis en geles de 2% (P/V) agarosa junto al marcador 100 bp ladder (PB-L).

En una primera instancia se chequeó mediante PCR la inserción del T-DNA en las líneas comerciales adquiridas. Estas plantas corresponden a la primer generación. Para obtener plantas knockout homocigotas se generó la descendencia de las mismas y se



procedió a su validación mediante PCR. En las distintas rondas se pueden obtener los patrones descritos en la **tabla III-III**.

**Tabla III-III.** Esquema simplificado de la obtención de productos de PCR. Indicando el resultado positivo y negativo de la amplificación. En plantas con genotipo homocigota la inserción del T-DNA interrumpe el gen, no permitiendo amplificación en caso de utilizar el par de cebadores específicos para el gen de interés, debido al gran tamaño del fragmento.

Genotipo	Reacción 1	Reacción 2
Salvaje	NO	SI
Heterocigota	SI	SI
Homocigota	SI	NO

Los oligonucleótidos cebadores específicos para detectar la inserción del T-DNA en los genes *AtGLY12*, *AtGLY13* y *AtGLY16* se detallan en la **tabla III-IV** y fueron diseñados empleando el software online del Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (SIGnAL, <http://signal.salk.edu>).

**Tabla III-IV Cebadores.** <sup>a</sup> cebadores específicos para detectar la inserción del T-DNA en cada caso, indicando el oligocebador derecho como RP y el izquierdo como LP; <sup>b</sup> cebadores universales que hibridan con el borde derecho (RB) y el borde izquierdo (LB) del T-DNA.

Gen	Cebador	Secuencia
<i>AtGLY12</i>	<b>SALK_131547</b> <sup>a</sup>	(LP) TGCCCTGTGACAACAACATAG
		(RP) ATTCGGAAAAACCGTCTTTTG
	<b>SALK_131526</b> <sup>a</sup>	(LP)TGCCCTGTGACAACAACATAG
		(RP) ATTCGGAAAAACCGTCTTTTG
<i>AtGLY13</i>	<b>SALK_103699</b> <sup>a</sup>	(LP) TGTAACGCGTCTGTGATGATC
		(RP) CCCAAAGCCAGTTCCAATATC
	<b>SALK_0509170</b> <sup>a</sup>	(LP) CAACAAATCAGAAGCCTCAGC
		(RP) TTCTAAATGGGCTGAGATCCC
	<b>SALK_110070</b> <sup>a</sup>	(LP) GCCAATCTCCTGAAACAATTTAG
		(RP) TATCGATCCACGAATCCTGTC
<i>AtGLY16</i>	<b>SALK_057042</b> <sup>a</sup>	(LP) GTCGTCACTTAATCTCCGACG
		(RP) TACAGTTTTTCGCCACCTTTTG
	<b>SALK_142650</b> <sup>a</sup>	(LP) TCTACAATGGTGTCCCTAGCG
		(RP) CACAGGAAAGCCAAAGTGAAG
	<b>SAIL_706</b> <sup>a</sup>	(LP) TCCTCAATCACAGCTTTTTGG
		(RP) CTCTGGGTTGTCTTTGTTTCG
	<b>SALK_116876</b> <sup>a</sup>	(LP) AGCAACACCAACAACGGATAC
		(RP) AGGAGAATCAGAGAAGCAGGC
	<b>SALK_RB</b> <sup>b</sup>	ATATATTGGCGGGTAAACCTAAGAA
	<b>SALK_LB</b> <sup>b</sup>	GTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC

### 3.5. Obtención de líneas transgénicas sobreexpresantes de *ZmGLYI*

En nuestro laboratorio, se obtuvo la secuencia codificante de la enzima glioxalasa I de maíz a partir de cDNA de granos de maíz de la línea moderadamente resistente a la infección por el hongo *F. verticillioides*, en ensayos de infección a campo. Este gen fue clonado previamente en el vector pGreenII, y transformado en cepas de *E.coli* DH5 $\alpha$ . A partir de estas bacterias se realizó la extracción de ADN plasmídico para luego realizar la transformación de células de *A. tumefaciens*.

#### *Extracción de ADN plasmídico*

La preparación de ADN plasmídico se llevó a cabo utilizando columnas QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), en combinación con el protocolo tradicional de lisis alcalina. A partir de una colonia aislada de la bacteria conteniendo el plásmido a extraer, se inocularon 3 mL de medio LB conteniendo el agente de selección adecuado, y se incubó con agitación a 37 °C durante toda la noche. El cultivo saturado se centrifugó a 2.000 x *g* por 3 min, el pellet de células se resuspendió en 100  $\mu$ L de solución SL1 fría (Tris-HCl 25 mM, pH 8, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, se agregaron 200  $\mu$ L de una solución recién preparada de SL2 (NaOH 0,2 N, SDS 1%) y se invirtió suavemente entre 4 a 6 veces. Por último, se agregaron 150  $\mu$ L de SL3 (acetato de sodio 5 M, acetato de potasio 3 M, ácido acético glacial 11,5% V/V), se agitó vigorosamente, se incubó en hielo durante 5 min y se centrifugó a 11.600 x *g* por 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo que contenía 300  $\mu$ L de NaI 6 M y 10  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M, pH 5,5. Todo el volumen se colocó en la columna QIAprep, se centrifugó durante 1 minuto a 11.600 x *g* y se descartó el eluido. Se adicionaron 750  $\mu$ L de etanol 80% (V/V) a la columna, se centrifugó dos veces durante 1 minuto a 11.600 x *g*, y se descartó el eluido. Luego, se adicionaron 50-100  $\mu$ L de agua estéril, se dejó reposar 1 minuto y se centrifugó 1 minuto a 11.600 x *g* para obtener la muestra en tubo eppendorf estéril. La integridad de los plasmídeos se chequeó mediante geles de Agarosa.

#### *Preparación de A. tumefaciens GV3101 pSOUP competentes*

Se empleó la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* que posee resistencia genómica a rifampicina y resistencia plasmídica (plásmido helper pSOUP) a tetraciclina. La misma es compatible con los vectores binarios utilizados en el presente trabajo que poseen

resistencia a kanamicina. Estas células bacterianas fueron utilizadas como vehículos para la transformación estable de *A. thaliana*.

Se inoculó 5 ml de LB suplementado con rifampicina (100 µg/mL), tetraciclina (5 µg/mL) y gentamicina (25 µg/mL) con la cepa de *A. tumefaciens*. Se creció durante toda la noche a 28 °C con agitación. Se inoculó 200 mL de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes con 3 mL del cultivo saturado. Se creció durante 4 horas a 28 °C en agitación. Luego se centrifugó a 4200 rpm durante 20 minutos a 4 °C. El precipitado obtenido se lavó con buffer TE estéril preenfriado (Tris-HCl 10 mM pH 8, 1mM EDTA pH 8). Se centrifugó nuevamente a 4200 rpm durante 20 minutos a 4 °C. Finalmente, las células se resuspendieron en 5 ml de LB y se alicuotaron en fracciones de 500 µl, las cuales se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

#### ***Transformación de A. tumefaciens mediante el método de congelamiento-descongelamiento***

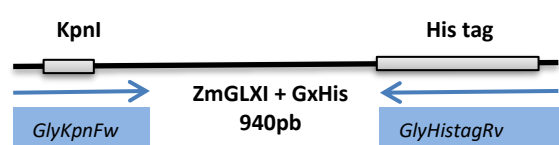
Los cultivos de *A. tumefaciens* competentes fueron descongelados en hielo para posteriormente agregarles 0,5-1 µg de ADN plasmídico (pGreenII-GLYI). Se mantuvieron en hielo durante 5 minutos, luego se los transfirió a N<sub>2</sub> líquido durante el mismo tiempo y posteriormente se incubó el cultivo a 37 °C durante 5 minutos. Luego se le adicionó 1 ml de LB y se lo colocó a 28 °C con agitación constante (180 rpm) durante un período de 2 horas. Una vez transcurrido este lapso de tiempo, el cultivo fue centrifugado a 5000 rpm y el pellet recuperado se resuspendió en 100 µL y se sembró en una placa con medio LB agar suplementado con los antibióticos rifampicina 100 µg/mL, gentamicina 25 µg/mL, tetraciclina 5 µg/mL y kanamicina 50 µg/mL. La placa fue incubada durante 2 días a 28 °C.

#### ***PCR de colonias***

Para realizar el chequeo de las colonias transformantes, se realizó el ensayo de PCR de colonias. El mismo se basa en la amplificación de la secuencia de interés utilizando como ADN molde una muestra de las colonias seleccionadas tomada con palillo estéril y cebadores específicos que hibridan con el constructo clonado en el vector pGreenII, el cual, posee el sitio de restricción para la enzima KpnI en un extremo y en el otro un tag que codifica para seis histidinas terminales (**Figura 3-2**). Como control negativo se utilizó el plásmido pGreenII vacío. Con este fin, las reacciones de PCR se desarrollaron en un volumen final de 20 µL, 0,2 mM de desoxirribonucleótidos trifosfato, 1 µM de oligonucleótidos cebadores, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>,

buffer de amplificación 1X (suministrado por el proveedor de la enzima) y 1 U de ADN Polimerasa Taq Pegasus (PB-L).

La amplificación se realizó en un termociclador Gene AmpR PCR System 2400 (Perkin Elmer), comenzando con una etapa de 5 minutos a 94°C (favorece la ruptura de las células), seguida de 30 ciclos compuestos por tres etapas: 1 minuto a 94 °C, 40 segundos a 60 °C y 1 minuto a 72 °C. Por último, se realizó una etapa de 5 min a 72 °C. Los productos se analizaron por electroforesis en geles de 2% (P/V) agarosa junto al marcador 100 bp ladder (PB-L).



**Figura 3-2. Inserto clonado en el vector pGreenII.** La secuencia codificante de la glioxalasa I de maíz fue clonada previamente en nuestro laboratorio en el vector pGreenII. La estrategia de clonado utilizada resultó en la incorporación de un sitio Kpn en un extremo y un tag de seis histidinas en el otro extremo. Esto permitió diseñar cebadores (GlyKpn Fw e GlyHistagRv) que hibriden específicamente con la secuencia deseada, descartando la posible amplificación de la glioxalasa I de *A. tumefaciens*.

#### *Preparación de A. thaliana para la transformación*

Se prepararon 10 pots con tierra negra bien irrigados y se procedió a la estratificación y cultivo como se describió anteriormente. Se crecieron las plantas hasta floración (aproximadamente 4 semanas). El momento adecuado es cuando los botones florales están emergiendo y no hay ninguna flor abierta, pero sí flores cerradas.

#### *Transformación de A. thaliana mediada por A. tumefaciens (Floral Dip)*

Para llevar a cabo la estrategia de transformación nos basamos en la estrategia descrita por Clough y Bent, (1998). Para ello, se inocularon 10 mL de medio LB suplementado con rifampicina, gentamicina, tetraciclina y kanamicina con *A. tumefaciens* transformada con la construcción pGreenII-ZmGLYI. Se incubó en agitación (180 rpm) durante 2 días a 28 °C. A partir de estos pre-inóculos saturados, se realizó una dilución 1/20 (5 mL del cultivo en 100 mL de LB) y se creció con agitación (180rpm) a 28 °C durante 24 h aproximadamente, hasta alcanzar OD<sub>600nm</sub> de 0,8. Posteriormente, se centrifugaron los cultivos a 4500 rpm a 4 °C durante 20 minutos y las células se resuspendieron en medio de infiltración (sacarosa 5% y 0.05% Silwet-L77).

Luego, se colocó dicha solución de *A. tumefaciens* en un recipiente y se sumergieron las plantas de *A. thaliana* ecotipo Columbia (col0) de manera que las inflorescencias quedaran completamente mojadas durante 1 minuto. Posteriormente, se colocaron las macetas en posición horizontal en una bandeja cubiertas con Saran Wrap (film de cocina) y se las mantuvo en cámara de cultivo durante 2 días. Transcurrido este tiempo, se las ubicó en posición vertical y se continuó con el crecimiento normal. Se dejó crecer las plantas hasta que las semillas se encontraran maduras. Luego, se recolectaron las semillas y se guardaron en tubos eppendorf.

#### ***Selección de transformantes putativas utilizando herbicida como marcador de selección***

Para seleccionar las plantas transformantes, las semillas esterilizadas se colocaron en placas de Petri conteniendo medio MS 1X pH 5,7 (ajustado con KOH) (Sigma Chemicals), 0.8% de agar y 5 µg/mL de bialophos (para seleccionar aquellas transformantes con el T-DNA). Se sembró como control semillas de plantas salvajes ecotipo Col-0. Durante el transcurso de la primera semana, se evidenciaron fenotipos distintivos, indicativos de plantas saludables: hojas no cloróticas y de color verde oscuro, junto con la aparición de hojas secundarias y alargamiento normal de la raíz. Finalmente, se realizó el trasplante de las probables plantas transgénicas a tierra. Se dejaron las plantas tapadas con Saran Wrap por 1 semana para conservar la humedad. Estas plantas corresponden a la generación T1, por lo cual, para obtener plantas homocigotas en el gen de interés, se deberá generar la descendencia de las mismas (T2 y T3).

#### ***Verificación de la inserción del T-DNA mediante extracción de ADN y PCR***

Para chequear la inserción del T-DNA en el evento inicial de transformación (T1) no solo se constató la supervivencia frente al marcador de selección *in planta* bialophos, sino que también se realizó extracción de DNA como se describe en la sección 3.4, utilizando los cebadores *GlyKpnFw* e *GlyHistagRv*, los cuales permiten amplificar la secuencia codificante de la glioxalasa I de maíz (**Figura 3-2**). Aquellas plantas que dan positivo en la selección y en la PCR fueron las utilizadas para obtención de su descendencia (T2 y T3).

### ***Validación de las transformantes T3 obtenidas***

Una vez obtenidas las transformantes T3 se procedió a evaluar la sobreexpresión. Para ello se realizó la extracción de ARN de dichas plantas y posteriormente, una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR) para chequear la expresión del gen de interés en el genoma de la planta. Los cebadores se detallan en la **Tabla III-V**, Sección 3.7.2.3.

### **3.6. Ensayos de infección de plantas de *Arabidopsis* con *Pseudomonas syringae***

*P. syringae* es un patógeno que infecta *Arabidopsis* y causa síntomas de enfermedad en condiciones de laboratorio. Una de las cepas virulentas más utilizadas es la cepa *P. syringae* pv *tomato* DC3000, con el que ya hemos trabajado en nuestro laboratorio (Falcone Ferreyra et al., 2015). Cuando se realiza la infección de plantas de *Arabidopsis* ecotipo Columbia susceptibles con un inóculo de dicho patógeno ( $10^8$  bacteria/ml) /, el primer signo de enfermedad es la aparición de manchas empapadas de agua en las hojas al día dos luego de la infección. Estos síntomas resultan de la liberación masiva de agua y nutrientes de las células infectadas. Estas manchas se vuelven necróticas al tercer día y el tejido circundante muestra clorosis extensiva.

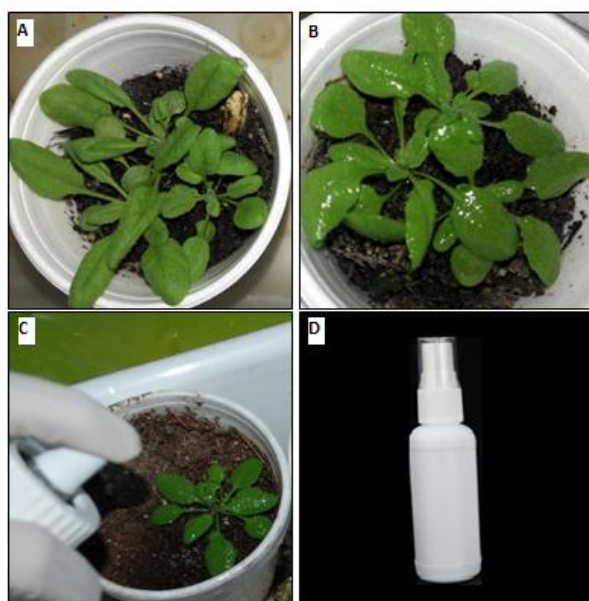
#### ***Crecimiento de *P. syringae****

Se empleó el medio King's agar sólido conteniendo 50 µg/ml de rifampicina y 50 µg/ml de kanamicina, antibióticos apropiados para seleccionar la cepa deseada.. Se realizó el inóculo utilizando ansa estéril. La temperatura óptima de crecimiento fue de 28°C. Luego se realizó el crecimiento en medio King's líquido, conteniendo los antibióticos apropiados mencionados anteriormente.

#### ***Infección con el patógeno y toma de muestra***

La infección con el patógeno se realizó siguiendo lo descripto por Katagiri et al. (2002). Las plantas de *Arabidopsis* usadas para la infección (*col0* Wild-type, mutantes *KO-AtGLY1*, y plantas transgénicas *35S::ZmGLY1*) fueron crecidas como se describió en la sección 3.3.1.1. La inoculación con *P. syringae* pv *tomato* DC3000 fue realizada en plantas de 3 semanas (antes de la floración), mediante rociado con una suspensión bacteriana conteniendo  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia\*ml<sup>-1</sup> en agua destilada conteniendo 0.05% (v/v) de Silwet L-77. La infección de las hojas se realizó mediante spray hasta

saturación. (Figura 3-3).



**Figura 3-3. Inoculación por spray de plantas de *Arabidopsis*.** (A) Planta de *Arabidopsis* antes de inoculación. (B) Planta de *Arabidopsis* luego de la inoculación. (C) Inoculación mediante spray. (D) Botella de spray utilizada.

#### *Cuantificación de bacterias dentro del tejido vegetal*

Las hojas fueron recolectadas y esterilizadas superficialmente como se describe a continuación. Hojas completas fueron removidas de la planta infectada y colocadas en una solución de etanol 70% por un minuto, mezclándolas suavemente. Las hojas fueron luego enjuagadas con agua estéril un minuto y secadas sobre papel de filtro estéril. Las hojas se colocaron en tubo eppendorf, previamente pesados y luego se agregó 100  $\mu$ l de agua estéril. El tejido fue completamente macerado utilizando un mortero. Posteriormente, las muestras fueron agitadas mediante vórtex. Se retiró 100  $\mu$ l del extracto y se diluyó en 900  $\mu$ l de agua destilada estéril. Al repetir estos procesos se crea una serie de diluciones 1:10 para cada muestra.

El procedimiento se repitió para cada réplica biológica de cada genotipo. En total se tomaron 3 réplicas de cada uno.

Las muestras fueron sembradas en medio King's agar suplementado con 50  $\mu$ g/ml de rifampicina y 50  $\mu$ g/ml de kanamicina, para seleccionar la cepa bacteriana inoculada. Se sembraron alícuotas de 10  $\mu$ l de cada una de las diluciones seriadas y luego se dejó secar sobre la superficie.



Las placas fueron incubadas a 28°C por dos días aproximadamente y luego se contaron las unidades formadoras de colonia para cada dilución de cada muestra. Para ello se usaron las gotas que tenían >10 y <70 colonias presentes en la dilución sembrada. La población presente en el tejido fue calculada en base al factor de dilución dividido por la cantidad de tejido presente en cada muestra.

### 3.7.Determinación de niveles transcripcionales mediante qRT-PCR

#### Extracción de ARN total

Se realizó la extracción de ARN total de hoja de plantas de *A. thaliana* crecidas en condiciones normales y bajo estrés biótico. El ARN total se aisló a partir de 100 mg de tejido utilizando el reactivo Quicksol (Embiotec) y siguiendo las indicaciones del fabricante.

#### Determinación de la integridad del ARN total extraído

La integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de 1 % (p/v) agarosa, preparado en TBE (Tris-Borato-EDTA pH=8) y con 0,5 µg/ml de SyberSafe (Invitrogen). Se sembraron 4 µl de cada muestra de ARN total con buffer de siembra 1 X (0,25 % (p/v) xilencianol, 0,25 % (p/v) azul de bromofenol, 30 % (v/v) glicerol), junto a 0,5 µg de ADN del fago λ digerido con *EcoRI* y *HindIII* (Promega) como marcador de tamaño molecular. La corrida electroforética se realizó en buffer de corrida 0,5 X TBE (44 mM Tris-HCl pH=8, 36 mM ácido bórico, 50 mM EDTA) y empleando una corriente constante de 80 mA. Los geles fueron visualizados en transiluminador UV (longitud de onda de trabajo: 302 nm, equipo BioChemSystem, UVP Bioimaging Systems) y fotografiados utilizando una cámara Hamamatsu 1394-C8484-51- 03G. Adicionalmente, los geles permitieron estimar la cantidad de ARN total extraído, mediante comparación con el marcador de peso molecular λ *EcoRI HindIII*.

#### Determinación de la cantidad del ARN total extraído

La cantidad y pureza del ARN total extraído se determinaron espectrofotométricamente de acuerdo con el método descrito por Sambrook y col. (1989). Se realizaron diluciones 1:200 de las muestras de ARN en H<sub>2</sub>O DEPC y, en un espectrofotómetro EPOCH 2 (BioTek Instruments) con paso óptico de 0,5 cm, se midieron las absorbancias a λ=230 nm, λ=260 nm y λ=280 nm utilizando el programa Gen5. Luego se

estimó la pureza de las extracciones calculando las relaciones  $Abs_{260\text{ nm}}/Abs_{230\text{ nm}}$  y  $Abs_{260\text{ nm}}/Abs_{280\text{ nm}}$ . Valores entre 1,5 y 2,1 indican una pureza apropiada de la preparación de ARN total respecto al contenido de compuestos fenólicos y proteínas, respectivamente. Finalmente, se realizaron los cálculos necesarios para estimar la cantidad de ARN en cada muestra, considerando que 1 unidad de absorbancia a  $\lambda=260\text{ nm}$  corresponde a 40  $\mu\text{g/ml}$  de ARN simple hebra.

### Eliminación de ADN genómico

Antes de proceder con la retrotranscripción, fue necesario eliminar el ADN genómico de las extracciones de ARN, evidenciable por PCR y/o en gel mediante el cual se evaluó integridad. Para ello, se trataron 2  $\mu\text{g}$  de ARN total con 1  $\mu\text{l}$  de ADNasa I (Promega), 0,25  $\mu\text{l}$  de RNAsin (inhibidor de ARNasas, Promega) y  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC hasta un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ , por 30 min a 37 °C. Posteriormente, se verificó la efectividad del tratamiento con ADNasa I, llevando a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 15  $\mu\text{l}$  con buffer 1 X Taq Pegasus (EMBIOTEC), 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM dNTPs, 2,5 U ADN polimerasa Taq Pegasus (EMBIOTEC), 0,5  $\mu\text{M}$  oligonucleótidos cebadores UBQF y UBQR (específicos del gen *UBQ10* -At4g05320-, tabla III-V) y 1  $\mu\text{l}$  de cada muestra de ARN total tratado con ADNasa I. Se realizaron los correspondientes controles de la reacción de amplificación: negativo en el que no se incluyó molde y positivo con ADNc previamente obtenido cuya amplificación con estos cebadores se conocía efectiva. Se utilizó un termociclador Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems), comenzando con una etapa de desnaturalización de 5 min a 94 °C; luego 40 ciclos del siguiente protocolo: 30 s de desnaturalización a 94 °C, 45 s a la temperatura de hibridación 56 °C, 1 min de extensión a 72 °C; y una etapa de extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en geles de 2 % (p/v) agarosa en 0,5  $\mu\text{g/ml}$  SyberSafe, sembrando 7  $\mu\text{l}$  de cada reacción. Por otro lado, se verificó la integridad del ARN total luego del tratamiento con ADNasa I, sembrando 1  $\mu\text{l}$  del ARN tratado en geles de 1 % (p/v) agarosa en 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de SyberSafe.

### 3.7.1. Retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

#### *Reacción de transcripción reversa (Retrotranscripción)*

Las reacciones de transcripción reversa se realizaron con el fin de obtener la primera hebra de ADNc a partir de cada muestra de ARN total. En tubos eppendorf de 1,5 ml se agregaron: volumen de ARN conteniendo 1 µg (cuantificado por espectrofotometría UV) y 1 µg de oligo(dT), completando hasta un volumen final de 15 µl con H<sub>2</sub>O DEPC. Se incubó la mezcla por 5 min a 70 °C (desnaturalización del ARN total), se transfirió rápidamente la misma a hielo y se agregaron 10 µl de buffer de reacción (1 mM dNTPs, 1X buffer M-MLV (Promega), 28 U RNasin y 200 U M-MLV (transcriptasa reversa) en H<sub>2</sub>O DEPC para completar un volumen final de 25 µl. A continuación, se incubó la preparación durante 2 h a 42 °C para hacer efectiva la retrotranscripción. Finalmente, se inactivó la enzima calentando la mezcla de reacción durante 10 min a 70 °C. El ADNc obtenido se diluyó al quinto en H<sub>2</sub>O DEPC para ser utilizado como molde en las reacciones de qRT-PCR. Previo a los análisis de qRT-PCR, los productos de ADNc se verificaron por PCR como se describió en la sección 3.3.4.5, utilizando oligonucleótidos cebadores específicos para *UBQ10* (At4g05320, tabla III-V) y los mismos controles, adecuando la desnaturalización inicial a 2 min a 94 °C y adicionando 1 µl de cada ADNc en dilución al quinto como molde. Para finalizar, se verificó la obtención de productos específicos mediante electroforesis en gel de 2 % (p/v) agarosa en 0,5 µg/ml de SyberSafe, utilizando 1 µg de marcador de peso molecular 100 bp (EMBIOTEC).

#### *Diseño de oligonucleótidos cebadores y verificación de su especificidad*

Para los estudios de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) del gen *ZmGLYI*, los cebadores fueron diseñados en base a la secuencias de ADNc publicada en la base de datos del NCBI. En el caso de los genes de Arabidopsis, trabajando con los accesos génicos correspondientes a *AtGLYI2*, *AtGLYI3* y *AtGLYI6* en la base de datos TAIR, se obtuvo la secuencia génica de cada uno. Se diseñaron pares de oligonucleótidos cebadores para la amplificación de un fragmento de 247, 243 y 233 pb del ARNm a evaluar. Esto se llevó a cabo utilizando el programa Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) (Rozen y Skaletsky, 2000), al que se le proveyeron

características especiales de los cebadores. Para los experimentos de qRT-PCR, se utilizó como gen normalizador a *UBQ10*, comprobada, previo a este trabajo, la estabilidad de su expresión en las muestras analizadas (Falcone Ferreyra et al 2015). En la **tabla III-V** se detallan las secuencias de oligonucleótidos cebadores utilizados en las reacciones de qRT-PCR y la longitud en pares de bases del amplicón esperado.

**Tabla III-V.** Oligonucleótidos cebadores utilizados en las reacciones de qRT-PCR

Gen	Acceso	Directo (5'-3')	Reverso (5'-3')	Amplicón (pb)
<i>AtGLY12</i>	AT1G08110	qAtGLY12f GGGTGGAATGAGCAAAAGAA	qAtGLY12r ATCGTTTGGTTTCTTGCA	247
<i>AtGLY13</i>	AT1G11840	qAtGLY13f CATAACCGCAAACACCAAAA	qAtGLY13r TCATCGCTCTTCTCATTCCA	243
<i>AtGLY16</i>	AT1G67280	qAtGLY16f TCCCTCATAAGCCATTTTCG	qAtGLY16r CATCATCCGTCCTATTGCT	233
<i>ZmGLY1</i>	GRMZM2G181192T03	qZmGLY1f AGCTTATCCAGAGGGCTGAC	qZmGLY1r CCCTTGCTGTATTCTGTGACT	232
<i>UBQ10</i>	AT4G05320	UBQF AAGCAGCTTGAGGATGGAC	UBQR AGATAACAGGAACGGAACATAGT	221

Previamente a las reacciones de qRT-PCR en sí, se realizó PCR sobre las muestras de ADNc obtenidas, utilizando los cebadores diseñados con el fin de corroborar que se amplifique específicamente el fragmento del tamaño esperado. El protocolo de PCR elegido fue equivalente a aquel que se utilizó en las reacciones de qRT-PCR sin considerar el colorante fluorescente. Los productos amplificados se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa 2 % (p/v) en 0,5 µg/ml de SyberSafe utilizando 1 µg de marcador de peso molecular 100 bp (EMBIOTEC).

La especificidad de los cebadores se evaluó mediante investigación *in silico* de la hibridación con otras secuencias conocidas utilizando las herramientas del programa PrimerSelect y BlastN, mediante inspección de las curvas de disociación de los productos de PCR y mediante la observación de bandas únicas al realizar la electroforesis de los productos obtenidos. Los resultados informados son a partir del uso de triplicado biológico.

### ***Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR)***

Se llevaron a cabo 4 reacciones de amplificación, una con cebadores para el normalizador *UBQ10*, y las otras tres con cebadores de *AtGLY12*, *AtGLY13* o *AtGLY16*, por cada preparación de ADNc retrotranscripto. Se incluyeron al menos tres réplicas biológicas por cada día y por cada condición en estudio. Las reacciones de amplificación por qRT-PCR se desarrollaron en un termociclador con sistema de detección Mx3005P QPCR (Agilent technologies, Stratagene, programa MxPro QPCR versión 4.10), y utilizando el colorante fluorescente SyberGreen I (Invitrogen). El volumen final de reacción fue de 20  $\mu$ l conteniendo: 1 X buffer GoTaq (Promega), 1,5 mM  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M dNTPs en mezcla equimolar, 0,5  $\mu$ M de cada oligonucleótido cebador, 0,8 U GoTaq ADN polimerasa, 1  $\mu$ l de una dilución al quinto del ADNc correspondiente a cada muestra analizada y  $H_2O$  destilada estéril hasta completar el volumen final. Cada reacción de PCR consistió en una desnaturalización inicial de 2 min a 94 °C, seguida de 40 ciclos de 4 etapas: 10 s a 96 °C (desnaturalización), 15 s a 58 °C (hibridación de cebadores), 1 min a 72 °C (elongación), y 1 s a 77 °C (lectura de fluorescencia). Por último, se realizó una etapa de elongación final durante 10 min a 72 °C. Las curvas de fusión para cada reacción de PCR se determinaron midiendo la disminución de fluorescencia de los productos obtenidos respecto al aumento de temperatura (de 65 a 95 °C). El cálculo de la expresión génica relativa al control de cada transcripto se llevó a cabo mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001). Por otro lado, el cálculo de la expresión génica relativa al gen de referencia utilizado se llevó a cabo mediante el método  $2^{-\Delta Cq}$ .

### ***Análisis estadístico***

Los datos obtenidos se analizaron a través de análisis de la variancia (ANOVA) y las diferencias significativas mínimas se calcularon por los tests de Fisher y Bonferroni ( $\alpha = 0,05$ ) usando el programa Sigma Stat 3.10 (Systat Software, Inc.).

## 4. Resultados

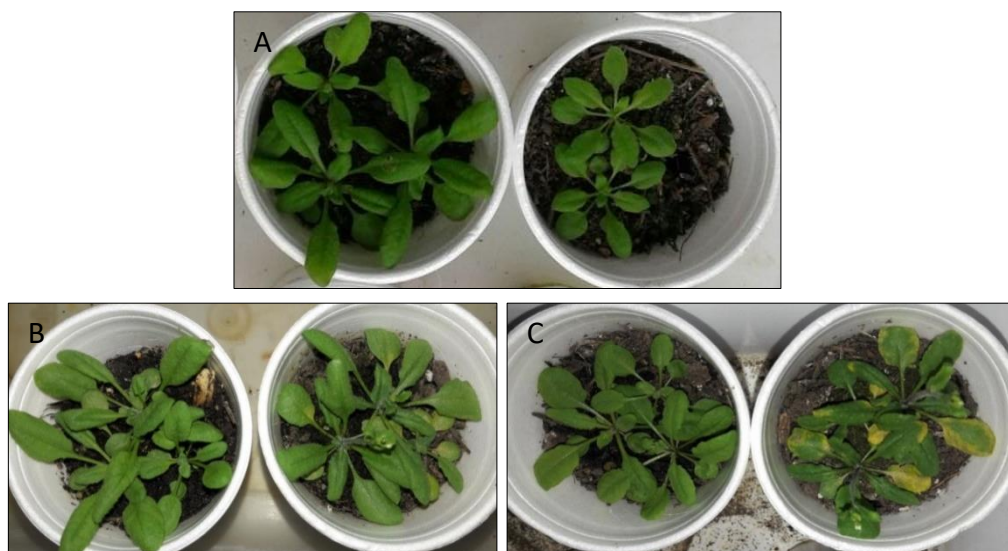
### 4.1. Evaluación del rol de la enzima glioxalasa I de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a estrés biótico

En primera instancia, se realizó la elección de los genes de glioxalasa I a estudiar de *A. thaliana* en base a un análisis *in silico* y a los datos disponibles en la literatura. Del análisis *in silico* se desprende que de los 11 genes anotados como GLYI solo 3 poseen los dominios necesarios para la actividad glioxalasa I. Estos genes se denominan *AtGLYI2*, *AtGLYI3* y *AtGLYI6*. Estos mismos genes han sido evaluados en otros trabajos donde se corrobora que poseen actividad glioxalasa I (Mustafitz et al., 2016).

Para evaluar el perfil de expresión de los genes de glioxalasa I en respuesta a estrés biótico se realizaron ensayos de infección de plantas de *A. thaliana* ecotipo Columbia (col0) con el patógeno bacteriano *P. syringae* pv tomato DC3000, con el que ya hemos trabajado en nuestro laboratorio (Falcone Ferreyra et al., 2015). En base a los resultados obtenidos se estableció el protocolo descrito en la sección 3.6.

#### ***Análisis fenotípico de severidad de síntoma de plantas de Arabidopsis col0:***

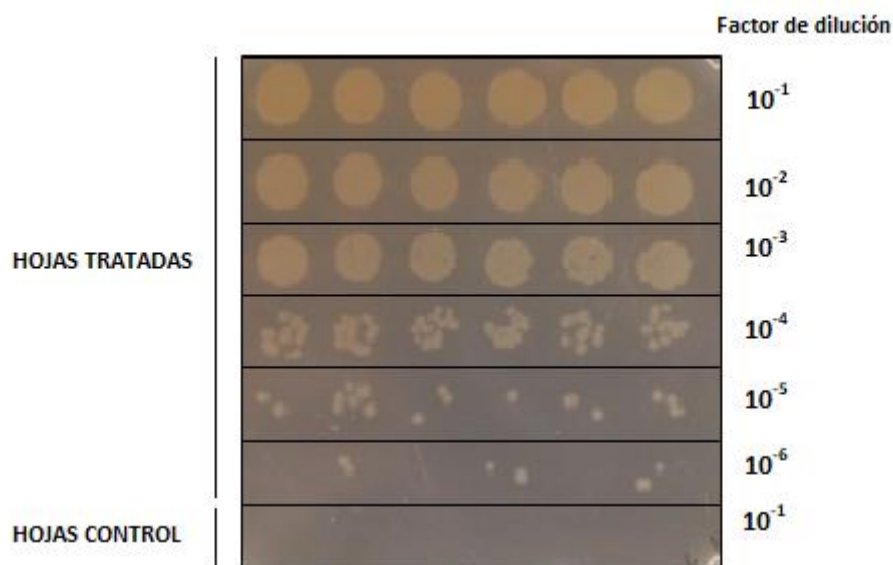
Plantas de *Arabidopsis* Col0 fueron inoculadas con *Pst* DC3000 a una  $OD_{600}=1,5$  *Pst* DC3000 ( $10^8$  ufc/ml), mediante la técnica de rociado. Los síntomas de infección consistentes en clorosis y necrosis del tejido inoculado se observaron dentro de los 2 a 3 días post inoculación (**Figura 4-1**).



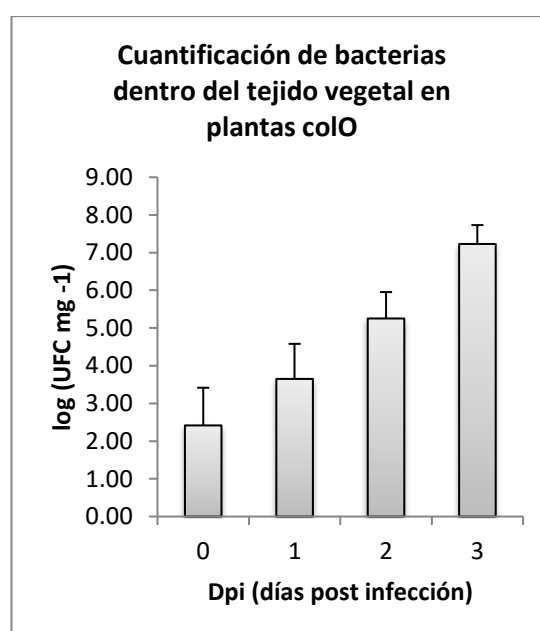
**Figura 4-1. Síntomas de enfermedad en hojas de *Arabidopsis col-0*.** Las plantas fueron rociadas con una solución conteniendo  $5 \times 10^8$  UFC/ml. **(A)** Plantas 1 día post- inoculación. **(B)** 2 días post- inoculación. **(C)** 3 días post- inoculación.

#### *Cuantificación de la población bacteriana en tejido de hojas de plantas col0 inoculadas con el patógeno*

El procedimiento de cuantificación que se describe en la sección 3.6 se realizó a tiempo 0 (1 hora post infección), tiempo 1 (1 día post infección), tiempo 2 (2 días post infección) y tiempo 3 (3 días post infección). En la **Figura 4-2** se muestra una placa de petri conteniendo diluciones seriadas realizadas a partir de un homogenado de hojas infectadas a tiempo 2 luego de la inoculación. Para evaluar la multiplicación del patógeno en el tejido vegetal se realizó un gráfico logarítmico (número de bacterias cultivables/mg tejido de hoja) versus tiempo post infección (en días). Los resultados obtenidos para Col0 se muestran en la **Figura 4-3**. Esta forma de cuantificación permite ver como se multiplica dicho patógeno dentro del tejido vegetal, permitiendo evaluar la resistencia o susceptibilidad de *A. thaliana* a la infección por el mismo.



**Figura 4-2. Determinación de la población bacteriana en tejido de hoja inoculado.** Una placa de Petri conteniendo King's agar con los antibióticos apropiados fue sembrada con 10  $\mu$ l de seis diluciones seriadas ( $10^{-1}$ - $10^{-6}$ ) de un homogenado de hojas de *Arabidopsis* inoculadas con *Pst* DC3000, a los 2 días post infección.



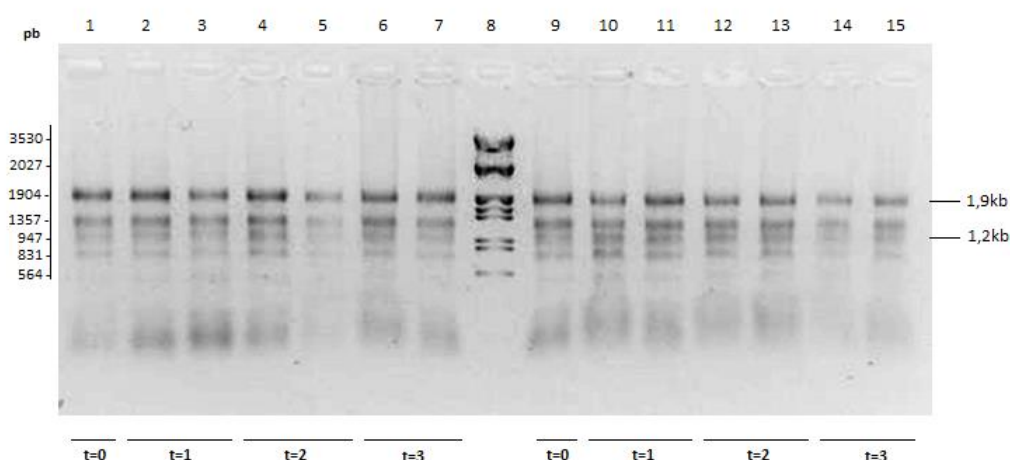
**Figura 4-3. Multiplicación de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 en hojas de *Arabidopsis*.** Las hojas fueron inoculadas con un cultivo bacteriano conteniendo  $5 \times 10^8$  UFC/ml y la población bacteriana en la planta fue determinada diariamente. Las barras de error indican la desviación estándar utilizando 3 réplicas para cada tratamiento.



### Extracciones de ARN total y determinación de la calidad del ARN total extraído

Para evaluar la expresión de las distintas glioxalasa I de *A. thaliana* en respuesta a la infección por el patógeno como primer paso se realizaron extracciones de ARN total de hojas verdes de plantas de 3 semanas, sometidas a estrés biótico así como de plantas control.

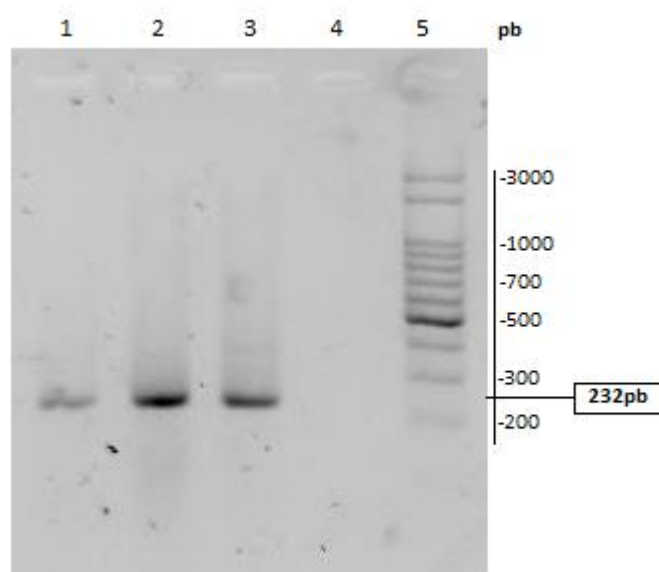
La **Figura 4-4** muestra un gel de 1 % (p/v) agarosa en el que se sembraron distintas muestras de ARN total de hojas de *A. thaliana*, sometidas a infección con el patógeno y control. En todas las calles del gel se pueden observar las bandas características de ARNr 25S y 18S (cercasas a 1.9 kb y 1.2 kb, respectivamente) como parámetro de integridad del ARN. Se hacen evidentes diferencias en cantidad y calidad de los ARN extraídos que permiten considerar solo aquellas muestras en óptimas condiciones para proseguir con la generación de ADNc por retrotranscripción para su posterior utilización en RT-qPCR.



**Figura 4-4. Gel de agarosa 1% conteniendo extracciones de ARN.** Calles 1-7: extracciones de ARN total de hojas de plantas col0 sometidas a infección por el patógeno, a tiempo 0, 1, 2 y 3 luego de realizado el tratamiento. Calle 8: 0,5 µg de marcador de peso molecular λ EcoRI/HindIII. Calles 9-15: extracciones de ARN total de hojas control, a los días 0, 1, 2 y 3 luego del rociado con agua conteniendo Silwet.

### Análisis de especificidad de los cebadores diseñados para los transcritos *AtGLYI2*, *AtGLYI3* y *AtGLYI6*

Previamente a la evaluación de los niveles de expresión por qRT-PCR, se realizó PCR sobre 3 de las muestras de ADNc obtenidas, utilizando los cebadores diseñados en la tabla III-V (Materiales y métodos), con el fin de corroborar la amplificación del fragmento de tamaño esperado. Los productos amplificados para los cebadores *qAtGLYI2f*, *qAtGLYI2r*, *qAtGLYI3f*, *qAtGLYI3r*, *qAtGLYI6f* y *qAtGLYI6r* se muestran en la **Figura 4.5**.

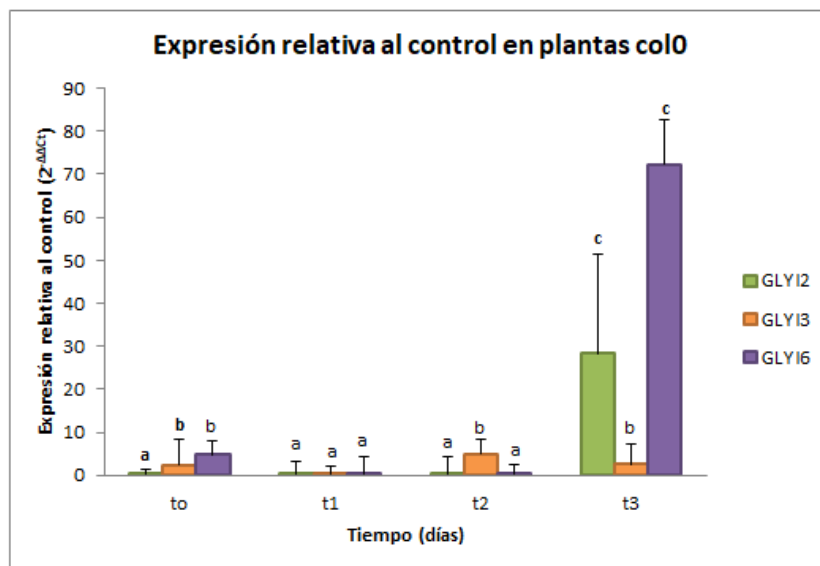


**Figura 4-5. PCR sobre ADNc para analizar la especificidad de los cebadores diseñados para RT-qPCR.** Se utilizaron los cebadores *qAtGLYI2f*, *qAtGLYI2r*, *qAtGLYI3f*, *qAtGLYI3r*, *qAtGLYI6f* y *qAtGLYI6r*. Calles 1 a 3: Productos de amplificación obtenidos a partir del ADNc proveniente de muestras de hoja de plantas col0 sometidas a infección por el patógeno. Calle 4: control negativo. Calle 5: marcador de peso molecular 100 pb ladder.

### Determinación de la expresión de *AtGLYI2*, *AtGLYI3* y *AtGLYI6* de *A. thaliana* en plantas col0 sometidas a estrés biótico

La determinación de niveles de los transcritos *AtGLYI2*, *AtGLYI3* y *AtGLYI6* se realizó mediante la técnica qRT-PCR, sobre muestras de ADNc obtenidas a partir de hojas de *A. thaliana* sometidas a estrés biótico, así como en plantas control. Se tomaron muestras de hojas, infectadas con el patógeno bacteriano *P. syringae* pv tomato DC3000 y muestras control. Para todos los casos, se tomaron tres réplicas biológicas. Los resultados obtenidos se

muestran en la **Figura 4-6**. Se puede observar que solo *AtGLYI2* y *AtGLYI6* aumentaron su expresión relativa a los 3 días post infección. Debido a esto, en los posteriores ensayos, se decidió recolectar muestras a los 0 y 3 días post infección.



**Figura 4-6.** Perfiles de expresión de glioaloxasas I de *A. thaliana* ecotipo *col0* frente a estrés biótico analizados mediante qRT-PCR. Se representa la expresión relativo como  $2^{*(-\Delta\Delta Ct)}$  (eje y) en función del tiempo, días post infección (eje x). Las letras diferenciales indican diferencias estadísticamente significativas en base a los tests de Fisher y Bonferroni ( $\alpha = 0,05$ ).

Los datos obtenidos se analizaron a través de análisis de la variancia (ANOVA) y las diferencias significativas mínimas se calcularon por usando el programa Sigma Stat 3.10 (Systat Software, Inc.).

#### 4.1.1. Obtención de líneas mutantes *knockout* homocigotas en los genes *ATGLYI2*, *ATGLYI3* y *ATGLYI6*

Con el objetivo de analizar el rol de los genes *AtGLYI2*, *AtGLYI3* y *AtGLYI6* frente a la infección con el patógeno, generamos plantas de *A. thaliana* mutantes *knockout* en cada uno de ellos.

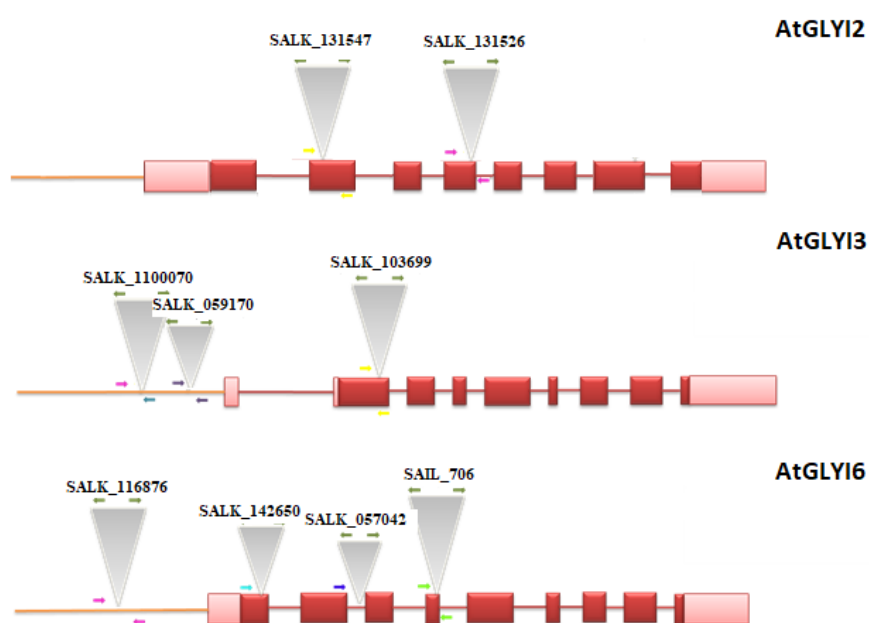
De esta manera, para realizar nuestro estudio, seleccionamos del Banco de mutantes de *Arabidopsis thaliana* (ABRC), las siguientes líneas mutantes por inserción de T-DNA en los genes de interés:

~ SALK\_131547 y SALK\_131526 (mutantes del gen *AtGLYI2*)

~ SALK\_103699, SALK\_059170 y SALK\_110070 (mutantes del gen *AtGLY13*)

~ SALK\_057042, SALK\_142650, SALK\_116876 y SAIL\_706 (mutantes del gen *AtGLY16*)

En la **Figura 4-7** se presenta un esquema de los sitios de inserción del T-DNA en las secuencias génicas de interés para la generación de las líneas mutantes.

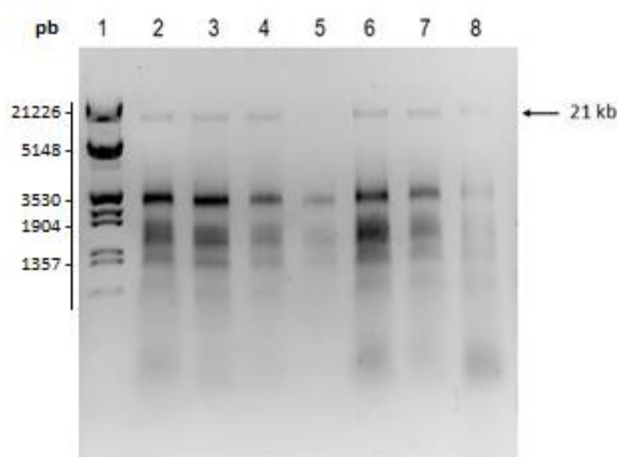


**Figura 4-7. Esquema de las líneas mutantes SALK.** La región promotora se encuentra representada como una línea naranja, en bloques rosas se indican las regiones 5' UTR y 3' UTR, los bloques rojos representan las secuencias exónicas y las líneas rojas indican las secuencias intrónicas. Los triángulos grises señalan el sitio de inserción del T-DNA en la secuencia génica para dar lugar a la línea mutante correspondiente cuyo nombre se indica en la parte superior. Con flechas verdes se señalan a los cebadores universales que hibridan con el borde derecho y el borde izquierdo del T-DNA. Las flechas de distintos colores indican a los cebadores que se diseñaron específicamente para detectar la inserción del T-DNA en cada caso.

Los estudios fenotípicos deben realizarse sobre líneas mutantes homocigotas, por lo cual fue necesario llevar a cabo su búsqueda mediante reacciones de PCR, como se detalla en la Sección 3.4.

### *Extracción de ADN genómico de las líneas de trabajo*

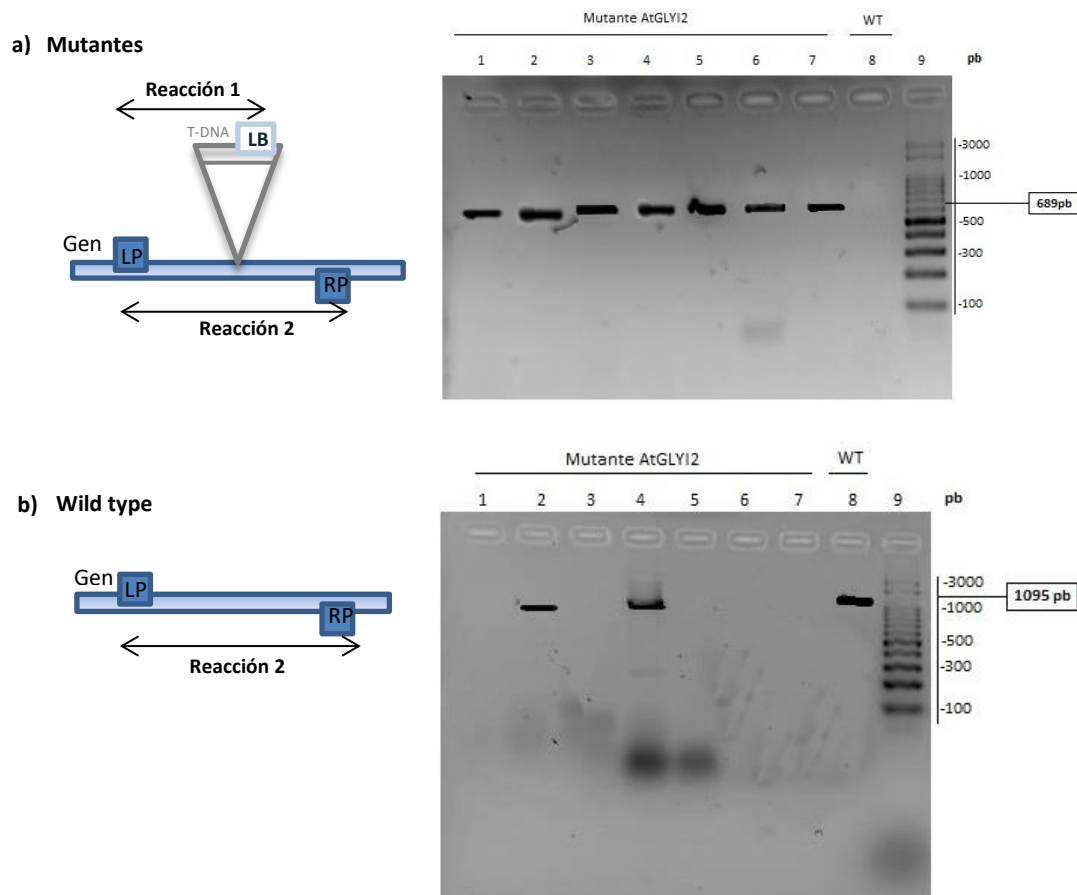
Utilizando el método mencionado en la sección 3.4 se realizó la extracción de ADN genómico de cada individuo sobre el que se pretendía evaluar la inserción del T-DNA sobre el locus *AtGLY12*, *AtGLY13* y *AtGLY16* respectivamente. Mediante electroforesis en geles de 1 % (p/v) agarosa fue posible evaluar la integridad del ADN genómico obtenido. Como se observa en la **Figura 4-8**, las bandas obtenidas son del tamaño esperado y no presentan signos de degradación aparente.



**Figura 4-8. Extracciones de ADN genómico de hojas de diferentes individuos.** Calle 1: marcador de peso molecular  $\lambda$  EcoRI/HindIII. Calles 2-8: extracciones de ADN genómico de hojas de *A. thaliana*.

### *PCR para verificar homocigosis*

Las reacciones de amplificación fueron diseñadas para cada una de las líneas como se detalla en la sección de 3.4. En la **Figura 4-9** podemos observar los geles de agarosa 1% resultantes del chequeo por PCR de las mutantes *AtGLY12*.



**Figura 4-9. Análisis genotípico de las plantas *AtGLYI2* por PCR** usando a) Primer específico que hibrida con el borde izquierdo del T-DNA (LB) y primer reverse específico *AtGLYI2*. b) Cebadores *forward* (LP) y *reverse* (RP) específicos para el gen *AtGLYI2*. Se muestran 7 líneas mutantes *AtGLYI2* (Salk\_131547) junto con la línea col0 salvaje (WT) que funciona como control.

Si bien partimos de todas las líneas comerciales antes adquiridas, luego de un extenso trabajo de chequeo por PCR, seleccionamos aquellas que brindaron un resultado positivo en la reacción 1 y negativo en la reacción 2. Por cuestiones de espacio y tiempo no se logró realizar el chequeo para todas las mutantes, ya que una vez obtenidas como mínimo 4 líneas mutantes homocigotas para cada glicoxalasa I de *Arabidopsis*, procedimos a evaluar su expresión.

Se han logrado obtener diferentes líneas mutantes homocigotas para la inserción del T-DNA. En la siguiente tabla se enumeran aquellas mutantes obtenidas cuya expresión se chequeó posteriormente por qRT-PCR.

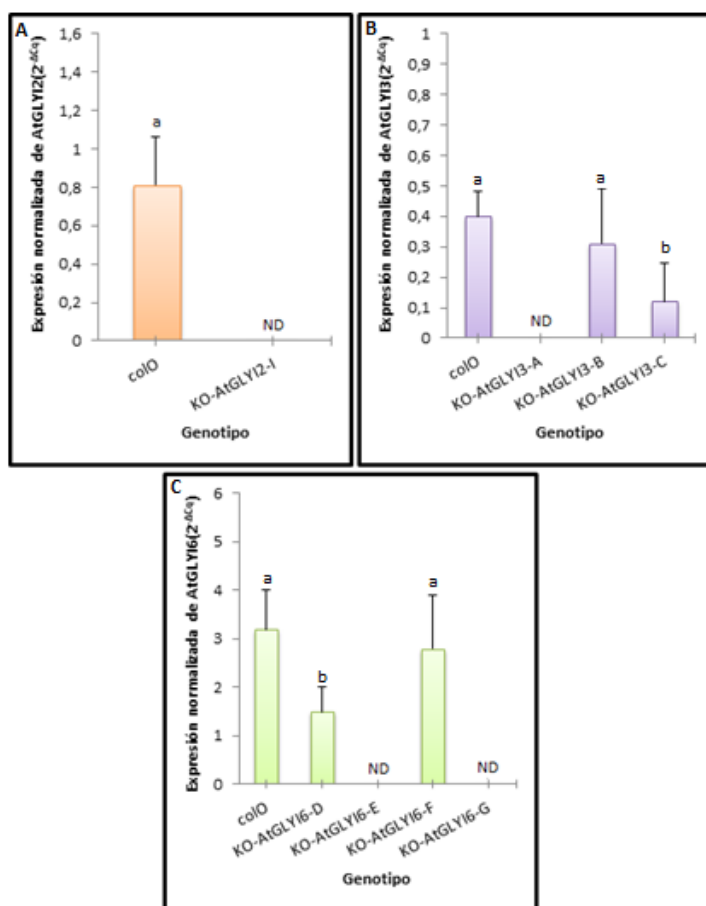
**Tabla IV-I.** Líneas mutantes homocigotas obtenidas utilizadas para los ensayos posteriores.

Gen	Línea comercial	Mutante homocigota obtenida
AtGLYI2	SalK_131547	KO-AtGLYI2-I
AtGLYI3	SalK_103699	KO-AtGLYI3-A
	SalK_059170	KO-AtGLYI3-B
	SalK_110070	KO-AtGLYI3-C
	SalK_057042	KO-AtGLYI3-D
AtGLYI6	SalK_142650	KO-AtGLYI6-E
	SalK_116876	KO-AtGLYI6-F
	Sail_706_603	KO-AtGLYI6-G

#### *Verificación de los niveles del ARNm AtGLYI en líneas homocigotas para la inserción*

Previo a la determinación de los ensayos fenotípicos fue pertinente realizar estudios transcripcionales que caractericen el efecto de la inserción de T-DNA sobre la expresión génica de *AtGLYI* en las líneas mutantes homocigotas verificadas a nivel de ADN genómico. Se llevaron a cabo reacciones qRT-PCR como se describe en la sección 3.7.1, utilizando muestras de hojas adultas de las líneas a caracterizar. La **Figura 4-10** muestra los niveles de expresión obtenidos para las líneas elegidas para realizar los ensayos fenotípicos, normalizados respecto al gen de referencia *UBQ10*.

Como se puede observar en la **Figura 4-10**, las mutantes homocigotas derivadas de la línea *KO-AtGLYI2-I*, *KO-AtGLYI3-A*, *KO-AtGLYI6-E* y *KO-AtGLYI6-G* no expresaron niveles detectables de transcritos, por lo que se concluye que son mutantes *knock-out* en cada una de las glioxalasa I de *Arabidopsis*. En cambio, para aquellas mutantes derivadas de otras líneas, se detectó la presencia de cada uno de los transcritos respectivamente. Esto puede deberse a que en estas líneas la posición del T-DNA es en su promotor o en un intrón. Por lo tanto, se descartó su uso para los ensayos fenotípicos.



**Figura 4-10. Niveles del transcritpo *AtGLYI* en hojas adultas de las líneas mutantes homocigotas.** A) Expresión normalizada de *AtGLYI2*. B) Expresión normalizada de *AtGLYI3*. C) Expresión normalizada de *AtGLYI6*. Valores de expresión normalizados a la expresión génica del gen de referencia *UBQ10* ( $2^{-\Delta Cq}$ , siendo  $Cq$  el ciclo de cuantificación). Aquellas barras indicadas con distintas letras presentan valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre sí, en base a los tests de Fisher y Bonferroni ( $\alpha = 0,05$ ).

#### 4.1.2. Obtención de líneas transgénicas sobreexpresantes de *ZmGLYI*

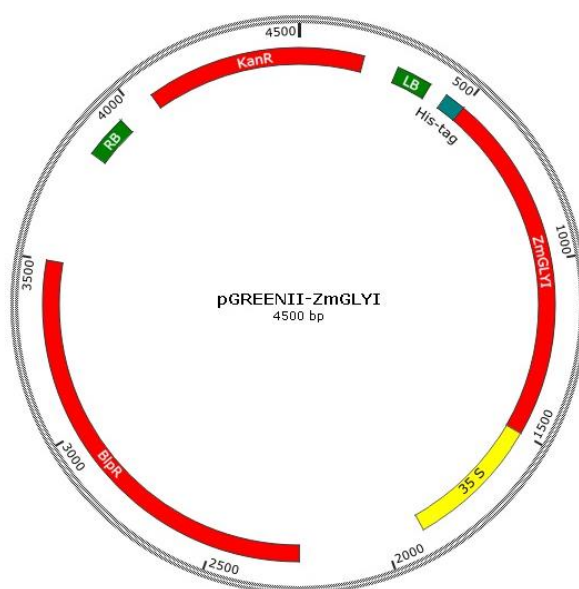
Con el fin de generar líneas estables con ganancia de función de *ZmGLYI*, se realizó la transformación de *A. thaliana* mediada por *A. tumefaciens* utilizando el método de “*Floral dip*” (Clough y Bent, 1998) y el vector binario pGreenII-*ZmGLYI*, con el secuencia codificante de *ZmGLYI* bajo el promotor 35S CaMV.

##### *Transformación estable de A. thaliana mediada por A. tumefaciens (Floral dip)*

En el laboratorio se contaba con el gen de la *glioxalasa I* (GRMZM2G181192, lactoilglutation liasa, EC 4.4.1.5). El mismo se obtuvo a partir de cDNA de granos de maíz de una línea moderadamente resistente al ataque por el hongo *F. verticillioides* en



ensayos de infección a campo. Previamente, este gen fue clonado en el vector expresión binario pGreenII, transformado en células de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Dicho vector posee la secuencia codificante de la *ZmGLYI*, con un tag de seis histidinas fusionadas en su extremo C- terminal, bajo control del promotor constitutivo de plantas 35S CaMV (Figura 4-11). A su vez, tiene la característica de tener el marcador seleccionable kanamicina, el cual, no es transferido a la planta, ya que su secuencia codificante se encuentra por fuera de la región transferida delimitada por los bordes izquierdo y derecho del T-DNA y posee el marcador de selección *in planta* bialophos.

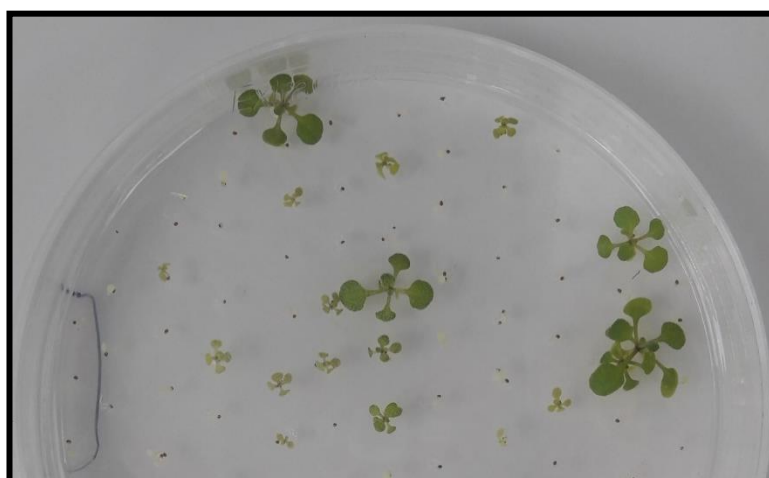


**Figura 4-11. Características del vector pGREENII-ZmGLYI.** Cuenta con un cassette de resistencia a kanamicina para selección en bacterias (Kan<sup>R</sup>), el gen de resistencia a bialophos (BIPR) para su selección *in planta*, el origen de replicación (ori), y el sitio de múltiple clonado donde se ubica *ZmGLYI*-6His.

Células de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con dicho plásmido se chequearon mediante extracción de DNA plasmídico y posterior secuenciación. Una vez verificado el correcto clonado en el vector de expresión, éste se utilizó para transformar la cepa *A. tumefaciens*. Las bacterias transformantes fueron seleccionadas en un medio de LB agar conteniendo los antibióticos correspondientes y validadas mediante ensayos de PCR en colonia (Sección 3.5).

La transformación de *A. thaliana* por el método de Floral dip se llevó a cabo utilizando la cepa *A. tumefaciens* conteniendo la construcción pGreenII *ZmGLYI*-6xHis, tal como se detalla en la Sección 3.5. Una vez obtenidas las plantas maduras, se recolectaron las semillas para luego realizar la selección de las transformantes putativas utilizando el marcador de selección in planta bialophos.

La selección de las plantas transformantes se realizó de manera simple y rápida, sembrando las semillas, previamente esterilizadas, en placa de Petri con medio MS agar 1X pH 5,7 y 5 µg/mL de bialophos. Durante el transcurso de la primera semana en la cual las placas se encontraban en la cámara de cultivo en presencia de luz, se evidenciaron fenotipos de crecimiento distintivos. Las transformantes generaron hipocotilos verdes mientras que las restantes tomaron un color amarillento y al cabo de 7 días murieron, además las transformantes generaron raíces bien establecidas incluidas en el medio selectivo (**Figura 4-12**).



**Figura 4-12. Selección de transformantes putativas.** Placa de Petri conteniendo MS agar 1X pH 5,7 y 5 µg/mL de bialophos. Recuadro lado izquierdo, semillas de *A. thaliana* ecotipo Col-0. Resto de la placa, semillas de plantas transformadas por la técnica Floral dip.

Las transformantes seleccionadas, se trasplantaron a tierra, para obtener su descendencia y así continuar con el chequeo para la obtención de plantas transgénicas sobreexpresantes de *ZmGLYI*-6xHis.

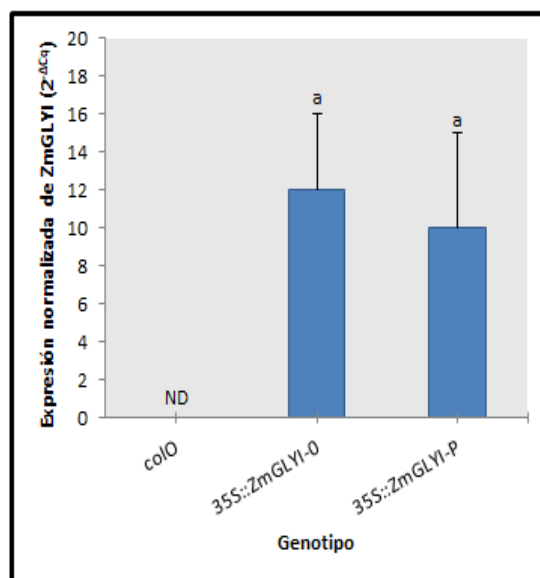
### ***Selección de líneas transgénicas sobreexpresantes***

La obtención de líneas transgénicas sobreexpresantes de *ZmGLYI* se realizó seleccionando individuos transformantes por su crecimiento en un medio conteniendo el marcador de selección *in planta* *bialophos*.

Se identificaron individuos transformantes por sus signos de planta saludable: hojas no cloróticas y de color verde oscuro, junto con la aparición de hojas secundarias y alargamiento normal de la raíz. Las semillas T2 obtenidas se expusieron a la misma selección. Las transformantes T2 se cultivaron hasta madurez y se eligieron las líneas cuya descendencia T3 se corroboró supervivencia frente al marcador de selección *bialophos*. Esto indica la presencia del T-DNA integrado en el genoma, con la construcción de sobreexpresión de *ZmGLYI* deseada. Se realizaron dos eventos independientes de transformación y selección. A estas líneas se las nombró *35S::ZmGLYI-O* y *35S::ZmGLYI-P*.

### ***Verificación de la presencia del ARNm *ZmGLYI* las líneas transformantes obtenidas***

Se procedió a determinar la presencia del transcripto en hojas verdes de las plantas transgénicas sobreexpresantes de *ZmGLYI* seleccionadas. Para ello se realizó el mismo procedimiento de crecimiento y extracción de mRNA realizado previamente con las plantas Col0 o mutantes *knockout*. La **Figura 4-13** muestra los resultados obtenidos para ambas líneas sobreexpresantes.



**Figura 4-13. Niveles del transcripto *ZmGLYI* en hojas adultas de las líneas transgénicas sobreexpresantes halladas.** Valores de expresión normalizados a la expresión génica del gen de referencia UBQ10 ( $2^{-\Delta Cq}$ , siendo  $Cq$  el ciclo de cuantificación). Aquellas barras indicadas con distintas letras presentan valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), en base a los tests de Fisher y Bonferroni ( $\alpha = 0,05$ ).

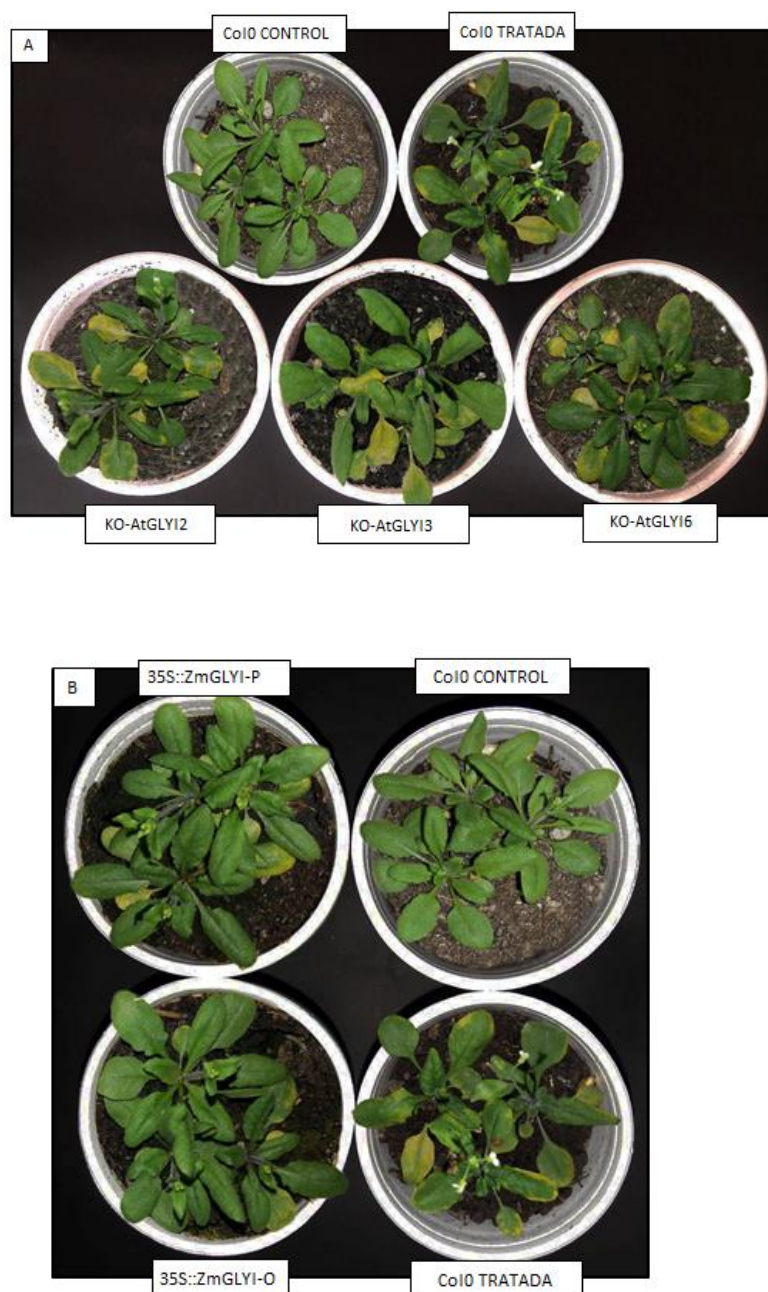
#### 4.1.3. Ensayos de infección por el patógeno en plantas de *Arabidopsis* col0, mutantes en las distintas GLYI y sobreexpresantes en glioxalasa I de maíz

Las plantas transformantes (*35S::ZmGLYI-O* y *35S::ZmGLYI-P*) al igual que las mutantes *knock out* seleccionadas (*KO-AtGLYI2-I*, *KO-AtGLYI3-A* y *KO-AtGLYI6-E*) fueron sometidas a infección por el patógeno y se evaluó su resistencia o susceptibilidad con respecto a plantas control (col0). El procedimiento de infección es descrito en la sección 3.5. En este caso se evaluó la severidad de síntoma en los tres tipos de plantas (mutantes *knock out*, sobreexpresantes y salvaje), se cuantificaron las unidades formadoras de colonia a tiempo 0 y al cabo de 3 días de infección y se determinaron los niveles de los transcriptos *AtGLYI2*, *AtGLYI3* y *AtGLYI6* en cada uno de los genotipos.

#### *Análisis fenotípico de severidad de síntoma en plantas wild type, transformantes y knock out*

En la **Figura 4-14 (A)** se muestran los síntomas de infección consistentes en clorosis y necrosis del tejido inoculado a los 3 días post inoculación, para plantas *knockout* y Col0 inoculadas con *Pst* DC3000 a una  $OD_{600}=1,5$ . A simple vista no puede deducirse que haya diferencias en la sintomatología desarrollada por las mutantes en comparación con la línea parental.

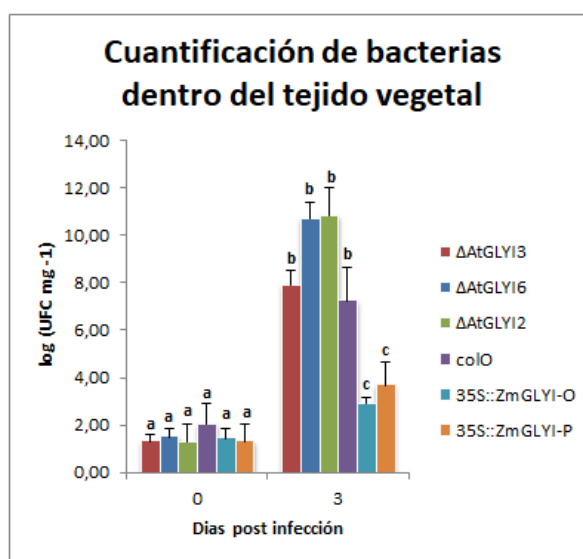
En la **Figura 4-14 (B)** se comparan los síntomas de infección consistentes en clorosis y necrosis del tejido inoculado en plantas transgénicas sobreexpresantes y *col0* inoculadas con *Pst* DC3000. Como puede observarse, las plantas que sobreexpresan la enzima *ZmGLYI* poseen menor desarrollo de síntomas en comparación con plantas *wild type*. Se puede observar que mientras que en las plantas *col0* aparecen síntomas en hojas jóvenes, en las plantas transgénicas dichos síntomas se limitan a hojas adultas.



**Figura 4-14. Síntomas de enfermedad en plantas *wild type*, knockout y sobreexpresantes a los 3 días post infección.**

### *Cuantificación de las unidades formadoras de colonia en plantas wild type, transformantes y knock out*

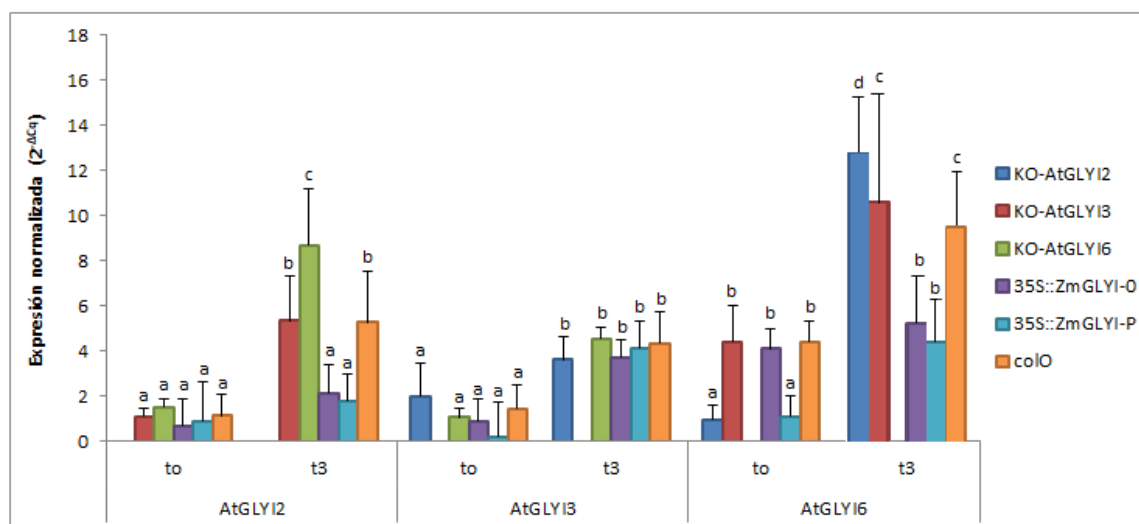
La determinación de la población bacteriana dentro del tejido vegetal se realizó como se describe en la sección 3.5. Se tomaron muestras a tiempo 0 (1 hora post infección) y tiempo 3 (3 días post infección). Los resultados obtenidos para cada uno de los genotipos analizados se muestran en la **Figura 4-15**. Como observa la figura, no existen diferencias significativas en la cantidad de inóculo inicial para cada línea ensayada, lo cual indica que las diferencias observadas entre cada genotipo no pueden atribuirse a variaciones en el inóculo de *Pst* DC3000. A tiempo 3 se observa que el crecimiento del patógeno en las plantas transgénicas que sobreexpresan la enzima glioxalasa I de maíz es significativamente menor comparado con la línea parental. También se puede concluir que el crecimiento bacteriano en las plantas mutantes no es significativamente mayor comparado con plantas col0.



**Figura 4-15 Cuantificación de inóculo bacteriano.** El crecimiento de *Ps. Syringae* pv. tomato DC3000 fue analizado en plantas de 4 semanas a 0 y 3 dpi. Las hojas fueron inoculadas con un cultivo bacteriano conteniendo  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Las barras representan el error estándar de 3 réplicas. Las letras diferenciales indican diferencias estadísticamente significativas en base a los tests de Fisher y Bonferroni ( $\alpha = 0,05$ ).

### Determinación de los niveles del transcripto *AtGLYI2*, *AtGLYI3* y *AtGLYI6* en cada uno de los genotipos ensayados

Se tomaron muestras de hojas, infectadas con el patógeno bacteriano *P. syringae* pv tomato DC3000 y muestras control para determinar los niveles de los transcriptos glicoxalasa I de *A. thaliana knockout* y sobreexpresantes en relación a la línea parental. El objetivo fue evaluar el patrón de expresión de cada uno de estos genes en las mutantes *knockout* y ante la sobreexpresión de *ZmGLYI* que está bajo control de un promotor constitutivo 35S. Para todos los casos, se utilizaron tres réplicas biológicas independientes. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 4-16**.



**Figura 4-16.** Niveles de expresión de transcriptos *AtGLYI2*, *AtGLYI3* y *AtGLYI6* en hojas adultas expuestas a estrés biótico. Valores de expresión normalizados a la expresión génica del gen de referencia UBQ10 ( $2^{-\Delta Cq}$ , siendo  $Cq$  el ciclo de cuantificación). Aquellas barras indicadas con distintas letras presentan valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre sí, en base a los tests de Fisher y Bonferroni ( $\alpha = 0,05$ ).

## 5. Discusión

### 5.1. Evaluación del rol de glioxalasa I en *A. thaliana*

El estrés biótico y abiótico afecta severamente el crecimiento de las plantas y reduce su productividad. El problema es aún más complicado debido al hecho de que en la naturaleza, las plantas a menudo están expuestas a múltiples estreses abióticos y bióticos. La respuesta de las plantas a estos tipos de estreses es invariablemente compleja ya que están involucrados numerosos mecanismos de adaptación y defensa que comprenden vías diversas. A pesar de que ha habido varios estudios que muestran cultivos con mayor tolerancia al estreses individuales como salinidad, frío y patógenos particulares (Mickelbart et al., 2015), no muchos informes han demostrado el papel de una única vía en respuesta y adaptación a múltiples estreses abióticos y bióticos. Apuntar a un metabolito o vía común que se regula de forma diferente en respuesta a múltiples estreses abióticos y bióticos puede representar una nueva aproximación en esta dirección.

Diferentes antecedentes proponen a la enzima glioxalasa I como punto clave en la resistencia a estreses abióticos. Además, estudios recientes indican que los niveles de enzima glioxalasa I se encuentran aumentados en plantas, en respuesta a infecciones fúngicas, sugiriendo que el mecanismo de detoxificación del metilglioxal es parte de un amplio sistema de defensa. Basados en esto, resulta interesante dilucidar el rol fisiológico que cumple la enzima glioxalasa I en plantas en la respuesta a estrés biótico, para ello nos propusimos como primer paso estudiar el comportamiento de dicho transcripto en respuesta al ataque por patógeno en el sistema modelo *A. thaliana*. De esta manera, en este trabajo de tesina se generaron plantas transgénicas que sobreexpresan la enzima glioxalasa I de maíz y a su vez se analizaron mutantes *knockout* de *A. thaliana* en los genes codificantes para dicha enzima. La labor de generar plantas *knockout* homocigotas y plantas transgénicas requirió de un exhausto trabajo previo a los ensayos fenotípicos.

En primer lugar, verificamos la generación de mutantes homocigotas y las plantas transgénicas obtenidas. De esta manera pudimos obtener al menos una línea homocigota de cada mutante *knockout* y dos líneas transgénicas que sobreexpresan la enzima *ZmGLYI*.



Los resultados de infección de plantas col0, muestran que los síntomas de enfermedad aparecen a los dos días post infección, y son más intensos al tercer día. De la cuantificación de bacterias presentes en el tejido vegetal se desprende que la población bacteriana aumenta a lo largo de los días y se incrementa a los 3 días post infección de manera concordante a lo observado con la aparición de síntomas (**Figura 4-1**), demostrando que las plantas evaluadas son susceptibles a la infección por *P. syringae*. El análisis de expresión de las tres isoformas de glioxalasa I de *A. thaliana* en plantas wild type sometidas a estrés biótico (**Figura 4-6**), muestra una mayor inducción de la expresión de *AtGLYI2* y *AtGLYI6* a los tres días de realizada la infección siendo la de *AtGLYI6* 2,5 veces mayor que *AtGLYI2*. En base a estos resultados, el aumento en la expresión relativa al control de los genes *AtGLYI2* y *AtGLYI6* en plantas Col0 en respuesta a estrés biótico, nos permiten hipotetizar que ambas enzimas podría tener un rol en la respuesta de defensa contra el patógeno.

Al analizar en un mismo procedimiento de infección lo que sucede con las plantas Col0, mutantes y sobreexpresantes, podemos ver fenotípicamente que las plantas sobreexpresantes son resistentes a la infección en comparación con las plantas Col0 y *knockout* (**Figura 4-14**). Esto se observa no solo como menor clorosis del tejido inoculado, sino también en la edad de las hojas infectadas. Las plantas transgénicas restringen la respuesta hipersensible a las hojas maduras, mientras que las hojas nuevas cuyo metabolismo es más activo no se infectan. De las dos líneas sobreexpresantes, la línea *35S::ZmGLYI-P* muestra mayor resistencia al estrés por *Pst* DC3000 que la línea *35S::ZmGLYI-O*. Esto puede deberse a que probablemente el gen de interés de cada línea se insertó en zonas reguladas diferencialmente. Las observaciones fenotípicas están respaldadas por la determinación de la población bacteriana presente dentro de la hoja (**Figura 4-15**). En el caso de las mutantes *knockout* no pudimos observar diferencias fenotípicas en un examen visual simple en comparación con las plantas Col0 (**Figura 4-14B**). Con respecto a la multiplicación del patógeno en las hojas de dichas mutantes, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en comparación con la línea parental (**Figura 4-15**). En conclusión, pudimos observar que las plantas que expresan la enzima de maíz de forma constitutiva condujeron a una menor multiplicación del patógeno y menor incidencia de la enfermedad.

Los experimentos de qRT-PCR efectuados en todas las mutantes en simultaneo (**Figura 4-16**), destinados a establecer los cambios en la expresión de la enzima glioxalasa I de *A. thaliana*, revelan que en el caso del gen *AtGLYI2*, su expresión normalizada al gen de referencia UBQ10 aumenta en comparación con la línea Col0 al tercer día en plantas con genotipo *KO-AtGLYI6*. Esto nos permite hipotetizar que la ausencia de *AtGLYI6* podría estar siendo compensada por la inducción de la expresión de *AtGLYI2*. Del mismo modo, la expresión del gen *AtGLYI6* aumenta al día 3 post infección en la mutante *KO-AtGLYI2*, sugiriendo que la ausencia de la glioxalasa I 2 sería compensada por la glioxalasa I 6. Al analizar la variación de los niveles del gen *AtGLYI3* en los diferentes genotipos vemos que no se produjeron diferencias estadísticamente significativas en las plantas mutantes y transgénicas en comparación con Col0. Por otro lado, la expresión constitutiva de la glioxalasa I de maíz en las plantas sobreexpresantes, no requiere la inducción de la expresión de los genes *AtGLYI2* y *AtGLYI6* para sobrellevar el estrés, contrariamente a lo observado para el gen *AtGLYI3*, que mantiene niveles similares a Col0. Un análisis comparativo de secuencias revela que la enzima glioxalasa I de maíz presenta similitud con las enzimas *AtGLYI3* y *AtGLYI6* de Arabidopsis, lo cual tiene lógica considerando que ambas enzimas han sido clasificadas como Ni(II) dependiente, mientras que *AtGLYI2* es dependiente de Zn(II) para llevar a cabo su actividad.

De esta manera y en base a los resultados mencionados anteriormente podemos hipotetizar un modelo de acción, donde ante una situación de estrés biótico se produce un aumento en los niveles de las isoformas glioxalasa I *AtGLYI2* y *AtGLYI6*. La ausencia de alguna de estas isoformas en las mutantes KO es compensada por un aumento de expresión de la otra, sugiriendo la existencia de un mecanismo regulatorio similar en ambos genes, dependiente o de los niveles de MG en la célula, o bien del tipo de estrés utilizado. Por otro lado, la sobreexpresión de la enzima de maíz en las células de Arabidopsis no requeriría la inducción de la expresión de las isoformas glioxalasa I *AtGLYI2* y *AtGLYI6* en respuesta a la infección. Esto no sucede con la isoforma *AtGLYI3*, cuyo gen se expresa en niveles similares a Col0, lo cual puede deberse a que el pico de expresión de dicho gen se da al día 2 post infección o bien a un mecanismo de respuesta diferencial. Estas hipótesis deben ser evaluadas a partir de nuevos estudios que permitan dilucidar los mecanismos regulatorios de los genes glioxalasa I.

Las mutantes *knockout* infectadas no presentan diferencias fenotípicas en comparación con Col0, ante la infección por el patógeno. Estas observaciones se condicen con la cuantificación de las UFC. Dicho comportamiento puede atribuirse a la presencia de las restantes glioxalasa I, o bien, a la glioxalasa III, la cual también actúa en la detoxificación de MG ya que es capaz de convertir irreversiblemente el MG en D-lactato en un único paso sin la intervención de cofactor e independiente de iones metálicos para su actividad (Misra et al., 1995; Subedi et al., 2011)

Con respecto a las líneas transgénicas obtenidas, pudimos observar que la expresión constitutiva de la enzima glioxalasa I de maíz otorga resistencia a la infección por el patógeno estudiado. Este resultado es prometedor considerando que la sobreexpresión del sistema glioxalasa ofrece muchas ventajas en la tolerancia a diferentes estreses abióticos. De manera que esta sería una buena estrategia generalizada de mejorar la tolerancia de las plantas a diferentes estreses.

## 5.2.Perspectivas

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo de tesina, sería interesante continuar evaluando que sucede con las plantas mutantes y transgénicas en comparación con Col0, midiendo ciertos parámetros morfológicos, fisiológicos y agronómicos, con el objetivo de determinar si la actividad de la enzima bajo estudio ofrece ventajas al respecto.

Se deberían realizar investigaciones detalladas para determinar el efecto de la sobreexpresión sobre la acumulación de MG, mantenimiento de la maquinaria fotosintética y pools de antioxidantes.

Con respecto a las glioxalastas de *A. thaliana*, nuevos experimentos podrían orientarse a la obtención de triple mutantes para dicha enzima. De esta manera se podría evaluar el rol de la enzima glioxalasa III en la respuesta al estrés biótico.

Debido a que el conocimiento de los mecanismos que regulan la expresión de los genes glioxalasa I es muy escaso se deberían realizar análisis *in silico* de la región promotora en busca de elementos *cis* de respuesta a estrés. Luego, se podría clonar la enzima *ZmGLYI* bajo control de su propio promotor para poder evaluar su regulación, ensayando distintas condiciones de estrés tanto biótico como abiótico.

## 6. Conclusiones

- El perfil de expresión de las glioxalases I de *A. thaliana* en respuesta a la inoculación con el patógeno reveló que dos de dichas enzimas presentan un máximo en la expresión a los tres días de realizado el tratamiento.
- Se obtuvieron tres líneas mutantes *knockout* homocigotas en tres genes de glioxalases I de *A. thaliana*.
- Se obtuvieron dos líneas de *Arabidopsis* sobreexpresantes en *ZmGLYI*
- Las mutantes *knockout* no mostraron mayor sensibilidad a la infección por el patógeno con respecto a plantas *wild type* Indicando que la ausencia de una de las isoformas puede complementarse con la expresión de las otras y/o con la acción de la glioxalasa III.
- Las plantas transgénicas que sobreexpresan la enzima glioxalasa I de maíz mostraron mayor resistencia a la infección con el patógeno, comparadas con la WT, y una disminución en las UFC a los tres días post infección, sugiriendo que dichas plantas son resistentes a la infección por el patógeno.

## 7. Referencias Bibliográficas

- Álvarez Viveros, M. F., Inostroza-Blancheteau, C., Timmermann, T., González, M., & Arce-Johnson, P. (2013). Overexpression of GlyI and GlyII genes in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) plants confers salt tolerance by decreasing oxidative stress. *Molecular Biology Reports*, 40(4), 3281–3290. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2403-4>
- Anwar, M., da Silva, J. A. T., & Fujit, M. (2011). Glyoxalase System and Reactive Oxygen Species Detoxification System in Plant Abiotic Stress Response and Tolerance: An Intimate Relationship. In *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*. InTech. <https://doi.org/10.5772/22421>
- Cameron, A. D., Ridderström, M., Olin, B., Kavarana, M. J., Creighton, D. J., & Mannervik, B. (1999). Reaction mechanism of glyoxalase I explored by an X-ray crystallographic analysis of the human enzyme in complex with a transition state analogue. *Biochemistry*, 38(41), 13480–13490. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10521255>
- Campos-Bermudez, V. A., Fauguel, C. M., Tronconi, M. A., Casati, P., Presello, D. A., & Andreo, C. S. (2013). Transcriptional and Metabolic Changes Associated to the Infection by *Fusarium verticillioides* in Maize Inbreds with Contrasting Ear Rot Resistance. *PLoS ONE*, 8(4), e61580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061580>
- Campos-Bermudez, V. A., Leite, N. R., Krog, R., Costa-Filho, A. J., Soncini, F. C., Oliva, G., & Vila, A. J. (2007). Biochemical and Structural Characterization of *Salmonella typhimurium* Glyoxalase II: New Insights into Metal Ion Selectivity<sup>†, ‡</sup>. *Biochemistry*, 46(39), 11069–11079. <https://doi.org/10.1021/bi7007245>
- Chen, Z.-Y., Brown, R. L., Damann, K. E., & Cleveland, T. E. (2004). Identification of a Maize Kernel Stress-Related Protein and Its Effect on Aflatoxin Accumulation. *Phytopathology*, 94(9), 938–945. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.9.938>
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 16(6), 735–743. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10069079>
- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(5), 3217–3266. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018>
- Espartero, J., Sanchez-Aguayo, I., & Pardo, J. M. (1995). Molecular characterization of glyoxalase-I from a higher plant; upregulation by stress. *Plant Molecular Biology*, 29(6), 1223–1233. <https://doi.org/10.1007/BF00020464>
- Falcone Ferreyra, M. L., Emiliani, J., Rodriguez, E. J., Campos-Bermudez, V. A., Grotewold, E., & Casati, P. (2015). The Identification of Maize and *Arabidopsis* Type I FLAVONE SYNTHASEs Links Flavones with Hormones and Biotic Interactions. *Plant Physiology*, 169(2), 1090–1107. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00515>
- Ghosh, A. (2017). Genome-Wide Identification of Glyoxalase Genes in *Medicago truncatula* and Their Expression Profiling in Response to Various Developmental and Environmental Stimuli. *Frontiers in Plant Science*, 8, 836. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00836>
- Ghosh, A., Kushwaha, H. R., Hasan, M. R., Pareek, A., Sopory, S. K., & Singla-Pareek, S. L. (2016).

- Presence of unique glyoxalase III proteins in plants indicates the existence of shorter route for methylglyoxal detoxification. *Scientific Reports*, 6(1), 18358. <https://doi.org/10.1038/srep18358>
- Gill, S. C., & von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*, 182(2), 319–326. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90602-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90602-7)
- Gomes, R. A., Miranda, H. V., Silva, M. S., Graça, G., Coelho, A. V., Ferreira, A. E., ... Freire, A. P. (2006). Yeast protein glycation *in vivo* by methylglyoxal. *FEBS Journal*, 273(23), 5273–5287. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05520.x>
- Gupta, B. K., Sahoo, K. K., Ghosh, A., Tripathi, A. K., Anwar, K., Das, P., ... Singla-Pareek, S. L. (2018). Manipulation of glyoxalase pathway confers tolerance to multiple stresses in rice. *Plant, Cell & Environment*, 41(5), 1186–1200. <https://doi.org/10.1111/pce.12968>
- Hasim, S., Hussin, N. A., Alomar, F., Bidasee, K. R., Nickerson, K. W., & Wilson, M. A. (2014). A Glutathione-independent Glyoxalase of the DJ-1 Superfamily Plays an Important Role in Managing Metabolically Generated Methylglyoxal in *Candida albicans*. *Journal of Biological Chemistry*, 289(3), 1662–1674. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.505784>
- Jain, M., Batth, R., Kumari, S., & Mustafiz, A. (2016). Arabidopsis thaliana Contains Both Ni<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> Dependent Glyoxalase I Enzymes and Ectopic Expression of the Latter Contributes More towards Abiotic Stress Tolerance in *E. coli*. *PloS One*, 11(7), e0159348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159348>
- Jain, M., Choudhary, D., Kale, R. K., & Bhalla-Sarin, N. (2002). Salt- and glyphosate-induced increase in glyoxalase I activity in cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea*). *Physiologia Plantarum*, 114(4), 499–505. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11975722>
- Johansen, Svendsen, & Rasmussen. (2000). Purification and cloning of the two domain glyoxalase I from wheat bran. *Plant Science : An International Journal of Experimental Plant Biology*, 155(1), 11–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10773335>
- Katagiri, F., Thilmony, R., & He, S. Y. (2002). The Arabidopsis thaliana-pseudomonas syringae interaction. *The Arabidopsis Book*, 1, e0039. <https://doi.org/10.1199/tab.0039>
- Kaur, C., Tripathi, A. K., Nutan, K. K., Sharma, S., Ghosh, A., Tripathi, J. K., ... Sopory, S. K. (2017). A nuclear-localized rice glyoxalase I enzyme, OsGLYI-8, functions in the detoxification of methylglyoxal in the nucleus. *The Plant Journal*, 89(3), 565–576. <https://doi.org/10.1111/tpj.13407>
- Kaur, C., Vishnoi, A., Ariyadasa, T. U., Bhattacharya, A., Singla-Pareek, S. L., & Sopory, S. K. (2013). Episodes of horizontal gene-transfer and gene-fusion led to co-existence of different metal-ion specific glyoxalase I. *Scientific Reports*, 3(1), 3076. <https://doi.org/10.1038/srep03076>
- Krautwald, M., & Münch, G. (2010). Advanced glycation end products as biomarkers and gerontotoxins – A basis to explore methylglyoxal-lowering agents for Alzheimer's disease? *Experimental Gerontology*, 45(10), 744–751. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.03.001>
- Kwon, K., Choi, D., Hyun, J. K., Jung, H. S., Baek, K., & Park, C. (2013). Novel glyoxalases from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal*, 280(14), 3328–3339. <https://doi.org/10.1111/febs.12321>
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

- Lages, N. F., Cordeiro, C., Sousa Silva, M., Ponces Freire, A., & Ferreira, A. E. N. (2012). Optimization of Time-Course Experiments for Kinetic Model Discrimination. *PLoS ONE*, 7(3), e32749. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032749>
- Lee, J., Song, J., Kwon, K., Jang, S., Kim, C., Baek, K., ... Park, C. (2012). Human DJ-1 and its homologs are novel glyoxalases. *Human Molecular Genetics*, 21(14), 3215–3225. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds155>
- Lin, F., Xu, J., Shi, J., Li, H., & Li, B. (2010). Molecular cloning and characterization of a novel glyoxalase I gene TaGly I in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Biology Reports*, 37(2), 729–735. <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9578-3>
- Maessen, D. E. M., Stehouwer, C. D. A., & Schalkwijk, C. G. (2015). The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. *Clinical Science*, 128(12), 839–861. <https://doi.org/10.1042/CS20140683>
- May1, M. J., Vernoux1, T., Leaver3, C., Van Montagu1, M., & Inzé, D. (1998). *Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development*. *Journal of Experimental Botany* (Vol. 49). Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/329d/81095e8f63f01821a87ad97ae40c2b3f3453.pdf>
- Misra, K., Banerjee, A. B., Ray, S., & Ray, M. (1995). Glyoxalase III from *Escherichia coli*: a single novel enzyme for the conversion of methylglyoxal into D-lactate without reduced glutathione. *The Biochemical Journal*, 305 ( Pt 3), 999–1003. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7848303>
- Mostofa, M. G., & Fujita, M. (2013). Salicylic acid alleviates copper toxicity in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings by up-regulating antioxidative and glyoxalase systems. *Ecotoxicology*, 22(6), 959–973. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1073-x>
- Mustafiz, A., Ghosh, A., Tripathi, A. K., Kaur, C., Ganguly, A. K., Bhavesh, N. S., ... Singla-Pareek, S. L. (2014). A unique  $\text{Ni}^{2+}$ -dependent and methylglyoxal-inducible rice glyoxalase I possesses a single active site and functions in abiotic stress response. *The Plant Journal*, 78(6), 951–963. <https://doi.org/10.1111/tpj.12521>
- Mustafiz, A., Singh, A. K., Pareek, A., Sopory, S. K., & Singla-Pareek, S. L. (2011). Genome-wide analysis of rice and *Arabidopsis* identifies two glyoxalase genes that are highly expressed in abiotic stresses. *Functional & Integrative Genomics*, 11(2), 293–305. <https://doi.org/10.1007/s10142-010-0203-2>
- Rabbani, N., & Thornalley, P. J. (2011). Glyoxalase in diabetes, obesity and related disorders. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 22(3), 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.02.015>
- Rabbani, N., & Thornalley, P. J. (2012). Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome. *Amino Acids*, 42(4), 1133–1142. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0783-0>
- Rae, C., Berners-Price, S. J., Bulliman, B. T., & Kuchel, P. W. (1990). Kinetic analysis of the human erythrocyte glyoxalase system using  $^1\text{H}$  NMR and a computer model. *European Journal of Biochemistry*, 193(1), 83–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2226450>
- Richard, J. P. (1993). Mechanism for the formation of methylglyoxal from triosephosphates. *Biochemical Society Transactions*, 21(2), 549–553. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8359530>
- Sankaranarayanan, S., Jamshed, M., Kumar, A., Skori, L., Scandola, S., Wang, T., ... Samuel, M. A.

- (2017). Glyoxalase Goes Green: The Expanding Roles of Glyoxalase in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4). <https://doi.org/10.3390/ijms18040898>
- Saxena, M., Bisht, R., Roy, S. D., Sopory, S. K., & Bhalla-Sarin, N. (2005). Cloning and characterization of a mitochondrial glyoxalase II from Brassica juncea that is upregulated by NaCl, Zn, and ABA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(3), 813–819. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.178>
- Schalkwijk, C. G. (2015). Vascular AGE-ing by methylglyoxal: the past, the present and the future. *Diabetologia*, 58(8), 1715–1719. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3597-5>
- Schmitz, J., Dittmar, I. C., Brockmann, J. D., Schmidt, M., Hüdig, M., Rossoni, A. W., & Maurino, V. G. (2017). Defense against Reactive Carbonyl Species Involves at Least Three Subcellular Compartments Where Individual Components of the System Respond to Cellular Sugar Status. *The Plant Cell*, 29(12), 3234–3254. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00258>
- Sousa Silva, M., Gomes, R. A., Ferreira, A. E. N., Ponces Freire, A., & Cordeiro, C. (2013). The glyoxalase pathway: the first hundred years... and beyond. *Biochemical Journal*, 453(1), 1–15. <https://doi.org/10.1042/BJ20121743>
- Su, Z., Sukdeo, N., & Honek, J. F. (2008).  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HSQC NMR Evidence for Distinct Specificity of Two Active Sites in *Escherichia coli* Glyoxalase I<sup>†</sup>. *Biochemistry*, 47(50), 13232–13241. <https://doi.org/10.1021/bi8013278>
- Subedi, K. P., Choi, D., Kim, I., Min, B., & Park, C. (2011). Hsp31 of *Escherichia coli* K-12 is glyoxalase III. *Molecular Microbiology*, 81(4), 926–936. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07736.x>
- SUKDEO, N., CLUGSTON, S. L., DAUB, E., & HONEK, J. F. (2004). Distinct classes of glyoxalase I: metal specificity of the *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Neisseria meningitidis* enzymes<sup>1</sup>. *Biochemical Journal*, 384(1), 111–117. <https://doi.org/10.1042/BJ20041006>
- Suttisansanee, U., Lau, K., Lagishetty, S., Rao, K. N., Swaminathan, S., Sauder, J. M., ... Honek, J. F. (2011). Structural Variation in Bacterial Glyoxalase I Enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 286(44), 38367–38374. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.251603>
- Suttisansanee, U., Ran, Y., Mullings, K. Y., Sukdeo, N., & Honek, J. F. (2015). Modulating glyoxalase I metal selectivity by deletional mutagenesis: underlying structural factors contributing to nickel activation profiles. *Metallomics*, 7(4), 605–612. <https://doi.org/10.1039/C4MT00299G>
- Thornalley, P. J. (1990). The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *The Biochemical Journal*, 269(1), 1–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2198020>
- Turra, G. L., Agostini, R. B., Fauguel, C. M., Presello, D. A., Andreo, C. S., González, J. M., & Campos-Bermudez, V. A. (2015). Structure of the novel monomeric glyoxalase I from *Zea mays*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 71(10), 2009–2020. <https://doi.org/10.1107/S1399004715015205>
- Umeda, M., Hara, C., Matsubayashi, Y., Li, H. H., Liu, Q., Tadokoro, F., ... Uchimiya, H. (1994). Expressed sequence tags from cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.) under stressed conditions: analysis of transcripts of genes engaged in ATP-generating pathways. *Plant Molecular Biology*, 25(3), 469–478. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8049371>
- Veena, Reddy, V. S., & Sopory, S. K. (1999). Glyoxalase I from Brassica juncea: molecular cloning, regulation and its over-expression confer tolerance in transgenic tobacco under stress. *The Plant*



- Journal : For Cell and Molecular Biology*, 17(4), 385–395. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10205896>
- Yadav, S. K., Singla-Pareek, S. L., & Sopory, S. K. (2008). An overview on the role of methylglyoxal and glyoxalases in plants. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 23(1–2), 51–68. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18533364>
- Zeng, Z., Xiong, F., Yu, X., Gong, X., Luo, J., Jiang, Y., ... Liu, Y. (2016). Overexpression of a glyoxalase gene, OsGly I , improves abiotic stress tolerance and grain yield in rice ( *Oryza sativa* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 109, 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.09.006>
- Zhao, Q., Su, Y., Wang, Z., Chen, C., Wu, T., & Huang, Y. (2014). Identification of glutathione (GSH)-independent glyoxalase III from *Schizosaccharomyces pombe*. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), 86. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-86>